

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局(43) 国際公開日  
2005年10月13日 (13.10.2005)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2005/095601 A1(51) 国際特許分類<sup>7</sup>: C12N 15/09, C12M 1/00, C12Q 1/68

(74) 代理人: 小林 浩, 外(KOBAYASHI, Hiroshi et al.); 〒1040028 東京都中央区八重洲二丁目 8 番 7 号 福岡ビル 9 階 阿部・井窪・片山法律事務所 Tokyo (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2005/006701

(22) 国際出願日: 2005年3月30日 (30.03.2005)

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願2004-106136 2004年3月31日 (31.03.2004) JP

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ヨーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 財団法人  
東京都医学研究機構(TOKYO METROPOLITAN ORGANIZATION FOR MEDICAL RESEARCH) [JP/JP];  
〒1638001 東京都新宿区西新宿2-8-1 Tokyo (JP).

(72) 発明者: および

(75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 池田 和隆  
(IKEDA, Kazutaka) [JP/JP]; 〒1680081 東京都杉並区  
宮前1-15-9 パークハウス杉並宮前402号  
Tokyo (JP). 井出 聰一郎 (IDE, Soichiro) [JP/JP]; 〒  
7370142 広島県呉市広駅前1-8-26 フォーレ  
ス広駅前A201 Hiroshima (JP). 曽良一郎 (SORA,  
Ichiro) [JP/JP]; 〒9893201 宮城県仙台市青葉区国見ヶ  
丘2-27-4 Miyagi (JP).

## 添付公開書類:

— 國際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される  
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語  
のガイド」を参照。

WO 2005/095601 A1

(54) Title: METHOD OF EVALUATING DRUG-SENSITIVITY BY ANALYZING MU-OPIOID RECEPTOR GENE

(54) 発明の名称: ミューオピオイド受容体遺伝子解析による薬物感受性の評価方法

(57) Abstract: It is intended to provide a method of evaluating a drug-sensitivity characterized by comprising linking a gene polymorphism in a mu-opioid receptor gene or a haplotype composed of this gene polymorphism to the sensitivity to a drug of an individual; and an oligonucleotide comprising a base sequence selected from the group consisting of the base sequences represented by SEQ ID NOS:1 to 98.

(57) 要約: 本発明は、ミューオピオイド受容体遺伝子の遺伝子多型又は該遺伝子多型により構成されるハプロタイプと、個体の薬物感受性とを関連づけることを特徴とする、薬物感受性の評価方法、および、配列番号1～98に示すいずれかの塩基配列からなる群から選択されるオリゴヌクレオチドを提供する。

## 明細書

## ミューオピオイド受容体遺伝子解析による薬物感受性の評価方法

## 5 技術分野

本発明は、ミュー ( $\mu$ ) オピオイド受容体遺伝子解析による薬物感受性の評価方法に関する。

## 背景技術

10 メタンフェタミンなどの覚醒剤は、モノアミン神経伝達を活性化することでその作用を発現しており、その中でもドパミンが最も直接的に覚醒剤の強化作用に関与していると考えられている（文献1）。ドパミン神経系とオピオイド神経系が相互に作用することは、一般的に良く知られている。これまでに、オピオイド受容体アゴニストが、神経終末でのドパミン代謝を調節し、シナプス間隙へのド  
15 パミン放出を惹起すること（文献2）や、メタンフェタミン誘発ドパミン神経伝達の変化を減弱させること（文献3, 4）が報告されている。さらに、近年の遺伝子欠損動物を用いた実験などからも、両神経系の密接な相互作用の存在が示されている（文献5～7）。それ故、オピオイド受容体の機能的変化によって、覚醒剤依存及び覚醒剤精神病様症状の形成され易さに個人差を生じる可能性が考え  
20 られる。

ところで、 $\mu$ オピオイド受容体は、内因性のオピオイドペプチドや麻薬性鎮痛薬が、鎮痛作用並びに依存形成、耐性形成、禁断症状といった様々な副作用を発現する上で、非常に重要な役割を担っていることが明らかにされてきた。さらに最近では、麻薬性鎮痛薬以外の薬物やアルコールに対する依存や精神疾患の一部  
25 にもその関与が知られてきている（文献8～11）。

とくに、オピオイドや非オピオイドの薬物による依存形成の促進ないし抑制に、 $\mu$ オピオイド受容体遺伝子多型が影響する可能性が考えられている。これまでに、 $\mu$ オピオイド受容体遺伝子の多型研究において、主に欧米人（Caucasian African-American）の遺伝子を用いて、翻訳領域や 5' UTR 並びに intron の一

部を中心に多型の存在が示されている（文献 12～14）。中でもアミノ酸変異を引き起こす一塩基多型 A118G に関しては、培養細胞系で発現させた変異型受容体において、内因性リガンドの一つである  $\beta$  エンドルフィンの結合親和性が上昇するとの報告があり、注目を集めている。さらに様々な人種において、A118G をを中心に麻薬・アルコール依存に関して調べられてきたが、関連性の有無は研究者によって異なっており、統一した結論には至っていないのが現状である（文献 15～21）。一方で、現在までに数多くの疾患・病態の遺伝的要因とヒト遺伝子多型の関係が研究されてきた。しかしながら、その多くは欧米人のゲノムを用いた解析であり、人種によって遺伝子多型の有無並びに発生頻度は大きく異なることが知られているので、日本人の疾患・病態と遺伝的要因を研究する上で、日本人のゲノムを用いた解析は必須である。

#### 文献

1. Uhl GR, Hall FS, Sora I. Cocaine, reward, movement and monoamine transporters. *Mol Psychiatry*, 7, 21-6, (2002)
2. Wood PL. Opioid regulation of CNS dopaminergic pathways: a review of methodology, receptor types, regional variations and species differences. *Peptides*, 4, 595-601, (1983)
3. El Daly E, Chefer V, Sandill S, Shippenberg TS. Modulation of the neurotoxic effects of methamphetamine by the selective kappa-opioid receptor agonist U69593. *J Neurochem*, 74, 1553-62, (2000)
4. Hayashi T, Tsao LI, Cadet JL, Su TP. [D-Ala2, D-Leu5]enkephalin blocks the methamphetamineinduced c-fos mRNA increase in mouse striatum. *Eur J Pharmacol*, 366, R7-8, (1999)
5. Smith JW, Fetko LA, Xu R, Wang Y. Dopamine D2L receptor knockout mice display deficits in positive and negative reinforcing properties of morphine and in avoidance learning. *Neuroscience*, 113, 755-65, (2002)
6. Spielewoy C, Gonon F, Roubert C, Fauchey V, Jaber M, Caron MG, et al. Increased rewarding properties of morphine in dopamine-transporter

knockout mice. *Eur J Neurosci*, 12, 1827-37, (2000)

7 . Chefer VI, Kieffer BL, Shippenberg TS. Basal and morphine-evoked dopaminergic neurotransmission in the nucleus accumbens of MOR- and DOR-knockout mice. *Eur J Neurosci*, 18, 1915-22, (2003)

5 8 . Lichtman AH, Sheikh SM, Loh HH, Martin BR. Opioid and cannabinoid modulation of precipitated withdrawal in delta(9)-tetrahydrocannabinol and morphine-dependent mice. *J Pharmacol Exp Ther*, 298, 1007-14, (2001)

10 9 . Becker A, Grecksch G, Kraus J, Loh HH, Schroeder H, Hollt V. Rewarding effects of ethanol and cocaine in mu opioid receptor-deficient mice. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 365, 296-302, (2002)

1 10 O . Berrendero F, Kieffer BL, Maldonado R. Attenuation of nicotine-induced antinociception, rewarding effects, and dependence in mu-opioid receptor knock-out mice. *J Neurosci*, 22, 10935-40, (2002)

15 1 11 . Contarino A, Picetti R, Matthes HW, Koob GF, Kieffer BL, Gold LH. Lack of reward and locomotor stimulation induced by heroin in mu-opioid receptor-deficient mice. *Eur J Pharmacol*, 446, 103-9, (2002)

20 1 12 . Uhl GR, Sora I, Wang Z. The mu opiate receptor as a candidate gene for pain: polymorphisms, variations in expression, nociception, and opiate responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 7752-5, (1999)

1 20 1 13 . Hoehe MR, Kopke K, Wendel B, Rohde K, Flachmeier C, Kidd KK, et al. Sequence variability and candidate gene analysis in complex disease: association of mu opioid receptor gene variation with substance dependence. *Hum Mol Genet*, 9, 2895-908, (2000)

25 1 14 . Mayer P, Hollt V. Allelic and somatic variations in the endogenous opioid system of humans. *Pharmacol Ther*, 91, 167-77, (2001)

1 15 . Bond C, LaForge KS, Tian M, Melia D, Zhang S, Borg L, et al. Single-nucleotide polymorphism in the human mu opioid receptor gene alters beta-endorphin binding and activity: possible implications for

opiate addiction. Proc Natl Acad Sci U S A, 95, 9608-13, (1998)

1 6 . Bergen AW, Kokoszka J, Peterson R, Long JC, Virkkunen M, Linnoila M, et al. Mu opioid receptor gene variants: lack of association with alcohol dependence. Mol Psychiatry, 2, 490-4, (1997)

5 1 7 . Sander T, Gscheidel N, Wendel B, Samochowiec J, Smolka M, Rommelspacher H, et al. Human mu-opioid receptor variation and alcohol dependence. Alcohol Clin Exp Res, 22, 2108-10, (1998)

1 8 . Gelernter J, Kranzler H, Cubells J. Genetics of two mu opioid receptor gene (OPRM1) exon I polymorphisms: population studies, and allele frequencies in alcohol- and drug-dependent subjects. Mol Psychiatry, 4, 476-83, (1999)

10 1 9 . Franke P, Wang T, Nothen MM, Knapp M, Neidt H, Albrecht S, et al. Nonreplication of association between mu-opioid-receptor gene (OPRM1) A118G polymorphism and substance dependence. Am J Med Genet, 105, 114-9, (2001)

15 2 0 . Shi J, Hui L, Xu Y, Wang F, Huang W, Hu G. Sequence variations in the mu-opioid receptor gene (OPRM1) associated with human addiction to heroin. Hum Mutat, 19, 459-60, (2002)

2 1 . Schinka JA, Town T, Abdullah L, Crawford FC, Ordorica PI, Francis E, et al. A functional polymorphism within the mu-opioid receptor gene and risk for abuse of alcohol and other substances. Mol Psychiatry, 7, 224-8, (2002)

## 発明の開示

25 本発明は、覚醒剤依存の中でも依存患者が多いメタンフェタミン依存及び覚醒剤精神病様症状の形成され易さに対する個人差を、 $\mu$ オピオイド受容体遺伝子多型を用いて予測する方法の提供を目的とする。

発明者は、鋭意研究を行った結果、いくつかの新たな $\mu$ オピオイド受容体遺伝子多型を見出し、メタンフェタミン依存性患者と健常人との間で有する当該遺伝

子多型が異なることを明らかにし、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は以下の通りである。

(1) ミューオオピオイド受容体遺伝子の遺伝子多型、又は当該遺伝子多型により構成されるハプロタイプと、個体の薬物感受性とを関連づけることを特徴とする、

5 薬物感受性の評価方法。

本発明において、上記の遺伝子多型は一塩基多型(SNP)、インサーション型多型、デリーション型多型及び塩基繰り返し多型からなる群から選ばれる少なくとも1つが挙げられる。また、上記遺伝子多型は表4に示される多型を例示することができる。さらに、上記ハプロタイプは、例えば表5又は8に示されるもので

10 ある。

上記薬物には $\mu$ オピオイド受容体機能修飾薬、例えば、メタンフェタミン、メチレンジオキシメタンフェタミン、アンフェタミン、デキストロアンフェタミン、ドペミン、モルヒネ、DAMGO、コデイン、メサドン、カルフェンタニール、フェンタニール、ヘロイン、コカイン、ナロキソン、ナルトレキソン、ナロルフィン、レバロルファン、ペンタゾシン、ブプレノルフィン、オキシコドン、ヒドロコドン、レボルファノール、エトルフィン、ジヒドロエトルフィン、ヒドロモルホン、オキシモルホン、エタノール、メタノール、ジエチルエーテル及びトラマドールからなる群から選ばれる少なくとも1つを挙げることができる。

(2) 上記の方法により評価された結果を指標として、個体に投与する薬物の種類及び/又は量を決定する方法。

(3) 上記の方法により評価された結果を指標として、個体に投与する薬物の副作用を予測する方法。

(4) 配列番号1～98に示すいずれかの塩基配列のうち第51番目の塩基を含む少なくとも10塩基の配列又はこれに相補的な配列からなるオリゴヌクレオチド。

上記のオリゴヌクレオチドは、好ましくは第51番目の塩基を含む10～45塩基の長さを有するものである。

(5) 配列番号1～98に示す塩基配列又はこれに相補的な塩基配列からなる群から選択されるオリゴヌクレオチド。

(6) 上記のオリゴヌクレオチドが支持体に固定されたマイクロアレイ。

(7) 上記のオリゴヌクレオチド及び／又は上記のマイクロアレイを含む、薬物感受性評価用キット。

5 本発明により、 $\mu$ オピオイド受容体遺伝子の新規多型が提供される。本発明の多型を用いることで、薬物に対する個人の感受性の差を評価することができる。この感受性評価方法により、モルヒネ等の麻薬性薬物の処方適正量を知ることが可能となる。

10 図面の簡単な説明

図1は、ミュー $\mu$ オピオイド受容体遺伝子の概略図（解析範囲並びに主要多型間の連鎖不平衡解析結果）である。

発明を実施するための最良の形態

15 以下、本発明を詳細に説明する。

1. 本発明の概要

本発明者は、健常人を対象とした $\mu$ オピオイド受容体遺伝子多型解析により、多くの新規遺伝子多型を同定した。ヒト $\mu$ オピオイド受容体の mRNA は、エクソン1～4にコードされており、エクソン1の前方には5'非翻訳領域が存在し、エクソン1～4の間にはそれぞれイントロン1～3が、そしてエクソン4の後方には3'非翻訳領域が存在している。そして、本発明の遺伝子多型は、これらのイントロン、エクソン等の中に既報の多型とは異なった新規のものが多数含まれていた。また、本発明の新規遺伝子多型のうち、イントロン3、及び3'非翻訳領域に見られる SNP の多くは、完全連鎖不平衡の関係にあった。ここで、連鎖平衡とは二つの多型間の染色体上の関係が独立な場合をいい、連鎖不平衡とは多型と多型が連鎖しているためにメンデルの独立の法則による平衡状態から逸脱している場合をいう。

また、本発明者は、上記 SNP 情報を利用して、一群の SNP の情報をハプロタイプ別に組織化した。ハプロタイプとは、一組の対立遺伝子のうちの一方（片方

の親に由来する遺伝子)において、相互に近隣する遺伝子や SNP などの遺伝的構成を意味する。ゲノム上近接する SNP は、連鎖不平衡の強いブロック (ハプロタイプブロック) で遺伝する。言い換えれば、ハプロタイプはこのハプロタイプブロック内の、同一遺伝子の並び方の組み合わせであるとも言える。そして、いくつつかの SNP が、ある表現 (例えば疾患の発生) に関連して出現する場合には、個々の SNP を全てタイピングしなくとも、ハプロタイプを構成するいくつかの SNP を解析することによって、患者の遺伝子型と表現型との関連を明らかにすることができます。本発明者は、ハプロタイプ解析の結果から、4つのハプロタイプブロックを推定することができた。

疾患の発症、あるいは薬物感受性は、ひとつの多型のみについて関連するのではなく、多くの場合ハプロタイプ単位で関連する。また、非翻訳領域外に存在する未知の多型を明らかにするのは非常に困難である。従って、ハプロタイプは、多型と疾患や薬物感受性との関連性を見出すために使用される。そこで、本発明は、薬物の感受性を評価するのに用いる遺伝子多型として、上記の SNP だけではなく、ハプロタイプを利用した方法も提供する。

本発明者は、ハプロタイプ解析の結果から明らかとなった4つの推定ハプロタイプブロックを代表する SNP の頻度を、健常人とメタンフェタミン依存患者において比較したところ、両者の出現頻度に差が存在し、特に、覚醒剤精神病様症状に分類して比較したときに、両者の差はより顕著であることを明らかにした。

従って、本発明で明らかとした SNP 又はハプロタイプを解析することによって、個々人の薬物感受性を評価することが可能となる。この薬物感受性は、薬物の種類や量を決定する上で重要な情報となる。特に、覚醒剤やモルヒネなどは、使用方法によっては社会的な大きな問題を生じる可能性もあるため、各個人に適切な投薬量を投薬前にあらかじめ知ることは極めて有用である。

25

## 2. $\mu$ オピオイド受容体遺伝子多型

本発明のヒト  $\mu$  オピオイド受容体遺伝子多型は、主に一塩基多型(single nucleotide polymorphism, SNP)、インサーション/デリーション型多型、及び塩基配列の繰り返し数が異なっていることにより生じる多型を含む。

SNP(SNPs)とは、遺伝子の特定の 1 塩基が他の塩基に置換することによる多型を意味する。インサーション／デリーション型多型とは、1 以上の塩基が欠失／挿入することによる多型を意味する。また、塩基配列の繰り返し数の異なることにより生じる多型（塩基繰り返し多型）には、繰り返す塩基数の違いによりマイクロサテライト多型（塩基数：2～4 塩基程度）と VNTR (variable number of tandem repeat)多型（繰り返し塩基：数～数十塩基）があり、その繰り返し数が個々人によって異なっている多型を意味する。

本発明によって明らかにされたヒト  $\mu$  オピオイド受容体遺伝子多型の情報を後述の表 1、表 2 及び表 3 に示す。これらの表には、1 塩基多型、インサーション／デリーション型多型及び塩基配列の繰り返し数が異なっていることにより生じる多型が含まれる。

本発明は、ミューオピオイド受容体遺伝子のうち、表 1、表 2 及び表 3 に示される遺伝子多型を含むオリゴヌクレオチドを提供する。本発明において表 1、2 及び 3 に表される遺伝子多型情報を得る方法は、以下の通りである。

ヒトから採取した血液検体から、フェノール法等を用いてゲノム DNA を精製する。その際、GFX Genomic Blood DNA Purification Kit 等の市販のゲノム DNA 抽出キットや装置を用いてもよい。次に、得られたゲノム DNA を鑄型として、PCR 法によりゲノム DNA をいくつかに分けて増幅し、シークエンス用の鑄型 DNA とする。本発明は、遺伝子の多型を対象とするため、PCR 法に用いる酵素はなるべく fidelity の高いものを用いることが望ましい。 $\mu$  オピオイド受容体の 5' 非翻訳領域 (5' UTR 及び 5' flanking region) は、開始コドンよりも上流 6000bp までの領域、好ましくは 5800bp までの領域を 2～4 つにわけて PCR 増幅を行う。エクソン 1、エクソン 2—イントロン 2—エクソン 3、エクソン 4、さらにイントロン 1 又は 3 の一部は、それぞれの箇所毎に PCR 法により全域を増幅する。エクソン 4 は終止コドンより下流の約 3000bp を含んでもよい。3' 非翻訳領域は終止コドンよりも下流に 14000bp、好ましくは 13900bp までの領域を 4～6 つの PCR により増幅を行う。これらの PCR 断片の全領域の塩基配列を、GenBank に公開されている配列情報に基づいて設計したプライマーを用いて約 500bp ずつシークエンス法により解読し、目的の遺伝子多型を得ることができる。このよ

うにして得られた多型情報を表1に示す。

表1 日本人健常人のゲノム上で見られたSNPとその多型頻度

Position	SNP name	Amino acid substitution	Allelic frequency	Sample size	Reported Allelic frequency
5'flanking region and 5'UTR	A-5580G		<1.5%	44	
	C-5342T		<1.5%	44	
	A-5308G		<1.5%	44	
	C-5236T		<1.5%	44	
	G-5026A		<1.5%	44	
	G-4936A		<1.5%	44	
	C-4504A		<1.5%	44	
	T-2694G		<1.5%	44	
	A-2693C		<1.5%	44	
	T-2683C		<1.5%	44	
	T-2402C		<1.5%	44	
	C-1609T		<1.5%	44	
	G-696T		<1.5%	44	
	G-490T		<1.5%	44	
Exon 1	<b>A118G</b>	Asn40Asp	<b>45.3%</b>	213	7.5 - 25.8 %
Intron 1	IVS1-A4980G	-	2.7%	187	
	IVS1-A4910G	-	2.7%	187	
	IVS1-G4690A	-	<1.5%	113	
	IVS1-T4591G	-	2.7%	113	
	IVS1-T4456G	-	<1.5%	113	
Intron 2	IVS2+G31A	-	2.6%	232	4.2%
	IVS2+G518A	-	<1.5%	232	
	<b>IVS2+G691C</b>	-	<b>81.9%</b>	232	42.5 - 53.3%
Intron 3	IVS3+G5807A	-	44.4%	179	
	IVS3+G5953A	-	13.1%	179	
	IVS3+A6151G	-	92.5%	179	
	IVS3+A8449G	-	9.2%	179	
	IVS3+C8497T	-	31.3%	179	
	IVS3-G8804A	-	9.5%	179	
3'UTR	TAA+G886A	-	10.8%	97	
	TAA+T1360C	-	<1.5%	97	
	TAA+T1371C	-	10.8%	97	
	TAA+G1670A	-	11.4%	44	
	TAA+G1709A	-	5.7%	44	
	TAA+C2007T	-	11.4%	44	
	TAA+A2109G	-	8.4%	179	
	TAA+A2274G	-	11.7%	179	
	TAA+G2287A	-	90.8%	179	
	TAA+G2395C	-	8.4%	179	

表 1において、「Position」はミューオピオイド遺伝子のゲノム上の位置を意味し、5'又は3'非翻訳領域、エクソン、イントロンを表す。「SNP name」は、ゲノム上の位置における SNP の名称であり、発明者が付与したものである。基  
5 本的に、3～4桁の数字及び記号の前と後にそれぞれ A、G、C 又は T のアルファベットが付与され、どの塩基の SNP であるかが識別されている。例えば「A-5580G」は、開始コドンから 5580 bp 上流(5'側)の塩基が A と G との多型であることを示している。「Intron-1」欄の「IVS1-A4980G」は、イントロン 1 の  
10 中の多型で、エクソン 2 に接するイントロン 1 の塩基を 1 として 4980bp 上流の塩基が A から G になった多型であることを示している。同様に、「3'UTR」欄中の「TAA+G886A」は、終止コドンである TAA から 3'側に 886bp の塩基が G から A になった多型であることを示している。

表2  $\mu$ オピオイド受容体遺伝子3' 非翻訳領域に見られる多型と連鎖不平衡

TAA+	reported	major allele	minor allele	LD	TAA+	reported	major allele	minor allele	LD
886	A	G	A	*	8386	A(13)	A(16)	A(13)	*
1360	T	T	C		9000	C	C	T	
1371	T	T	C	*	9564	A	G		
1670	A	G	A	*	9669	G	A	G	*
1709	G	G	A		9716	T	T	A	
2007	C	C	T	*	9839	T	G	T	*
2026	G	G	A		9994	C	A	C	*
2109	A	A	G	*	10083	C	C	A	
2274	A	A	G		10223	A(4)	A(3)	A(4)	*
2287	G	A	G	*	10247	A	T	A	*
2395	G	G	C	(*)	10535	A	G		
2458	G	G	C		10704	G	G	A	
2482	T	T	C		10752	T	G	T	*
2497	G	G	A		11100	C	T		
2656	G	G	T	*	11129	C	A	C	*
2714	C	A			11132	CA(17)	CA(17)	CA(14)	*
2820	G	G	T	*	11133	A	A	G	
2907	G	G	T		11368	TCTC	-	TCTC	*
3423	T	C			11411	T	T	C	
4026	A	G			11431	T	C	T	*
4585	A(6)	A(5)	A(6)		11449	-	TTTC	-	*
4861	A	A	C		11541	G	G	A	*
5359	A	A	G		11602	A	C	A	*
6074	A	A	C		11650	C	T		
6866	T	T	G	*	11918	C	C	T	*
6922	C	G	C	*	11956	A	C		
7075-7396	322 bp	-			12143	A	A	G	*
7427	C	C	T	*	12630	A	G		
7483	A	-			12681	T	T	C	*
7536	T	C	T	*	12831	T	C		
7589	A	G	G		12834	G	C		
8116	C	T	C	*	13236	T(15)	T(14)	T(15)	
8165	C	T	T		13971	G	T		
8281	G	A	A						

距離は終止コドン(TAA)からの塩基数で表している。reportedはgenebank配列での遺伝型、major、minorはそれぞれ日本人のゲノム上で多数派と少数派の遺伝型を表している。表中括弧内の数値は前の塩基の繰り返し数、"- " は欠失ないし挿入を意味する。LD (Linkage disequilibrium) 欄の\*は有意且つ完全連鎖不平衡 ( $D'=1.000$ 、 $r^2=1.000$ ) であった多型群に属する多型で、(\*)は有意に連鎖不平衡 ( $D'=1.000$ ) であった多型であることを示す。

表2のSNPは、3'非翻訳領域における多型を示す。「TAA+」の列は、 $\mu$ オピオイド受容体の終止コドンであるTAAからの塩基数を示している。「reported」は、GenBank中に登録されている配列での遺伝子型を、「major allele」、「minor allele」は、それぞれ日本人ゲノム上で多数派と少数派の遺伝子型を表す。かつこの値は前の塩基の繰り返し数を表し、例えば「A(6)」は、Aが6つ続いていることを意味する。「-」は欠失(デリーション)又は挿入(インサーション)を意味する。「LD」(Linkage disequilibrium:連鎖不平衡)の列の「\*」は、有意かつ完全連鎖不平衡( $D'=1.000$ 、 $r^2=1.000$ )であることを意味する。

表3は、健常人における $\mu$ オピオイド受容体遺伝子の塩基繰り返し多型の例を示す。

表3 健常人における $\mu$ オピオイド受容体遺伝子の塩基繰り返し多型

	number of repeats	11	12	13	14	15							
IVS3+6113 (GT) $n$	control (2n=358) (%)	35 (9.8)	1 (0.3)	284 (79.3)	33 (9.2)	5 (1.4)							
	number of repeats	2	-	8	9	10	11	12	13	14	15	16	
IVS3+8761 (32bp) $n$	control (2n=358) (%)	34 (9.5)	-	1 (0.3)	12 (3.4)	100 (27.9)	33 (9.2)	118 (33.0)	18 (5.0)	9 (2.5)	6 (1.7)	25 (7.0)	2 (0.6)

括弧内の数値は全体における%を表す。

表3において、「IVS3+6113(GT) $n$ 」とは、イントロン3において、エクソン3に接するイントロン3の塩基を1として6113、6114bp下流に位置するGTをn回繰り返す多型を意味する。また、「IVS3+8761(32bp) $n$ 」とは、イントロン3において同様に8761bp下流に位置する23bpを一単位としてn回繰り返す多型を意味する。

表1、2及び3に示される多型は、本発明の $\mu$ オピオイド受容体遺伝子多型に含まれる。また、本発明の遺伝子多型を含むオリゴヌクレオチドを表4に示す。例えば、本発明のオリゴヌクレオチドは、前記の多型を含有する配列番号1～98に示す塩基配列又はこれに相補的な塩基配列から選択されるオリゴヌクレオチドである(表4)。

表 4

(表 4-2)

(表 4-3)

表 4 (配列番号 1 ~ 9 8) には 101 塩基が表示されており、その 51 番目に多型部位を表示してある。「a/g」と表示したものは「a」と「g」の多型であることを意味し、「c/t」は「c」と「t」の多型であることを意味する。また、「(ac) $n$ 」は「ac」が  $n$  回繰り返されている多型を意味し、「del(a)」は「a」のデリーション型多型であり、「ins(tttc)」は「tttc」のインサーション型多型であることを意味する。他の塩基についても同様に表示してある。このうち、本発明においては、表 4 に示す塩基配列 (配列番号 1 ~ 9 8) の多型部位 (第 51 番目の塩基) を含む少なくとも 10 塩基、好ましくは 10~100 塩基、より好ましくは 10~45 塩基、さらに好ましくは 14~25 塩基を有するオリゴヌクレオチド及びこれに相補的なオリゴヌクレオチドを提供する。ここで、「51 番目の塩基」は多型部位の塩基を意味し、当該塩基が必ずしも 1 個の塩基であるとは限らない。従って、デリーション型の多型では塩基は存在しないため塩基数としては算入しないこととし、また、複数の塩基が繰り返されていても「第 51 番目の塩基」として数えることとする。

なお、表 4において、「TAA+7075del(322bp)」と表示した遺伝子多型 (配列番号 5 8) に含まれる 322bp の配列を、表の枠外下に示す。

### 3. ハプロタイプ解析

本発明においては、上記遺伝子多型のうち SNP を用いてハプロタイプを構築することができる。ハプロタイプ解析の対象となる SNP は、その多型頻度が 0.5% 以上のものであればよく、好ましくは 1%、より好ましくは 5% 以上のものを選択することができる。また、ハプロタイプ解析の対象となる SNP は、全部であってもその一部であってもよい。

ハプロタイプ解析は種々のコンピュータープログラムで解析することが可能であり、例えば、Arlequin program (<http://anthro.unige.ch/arlequin> で入手) (Schneider S, Roessli D, Excoffier L. Arlequin 2000: a software for population genetics data analysis.Ver 2.000. Genetics and Biometry Lab, Dept of Anthropology Univ of Geneva.)を用いることができる。

ハプロタイプ解析の例として、前記 2.においてのように見出した多型のうち、多型頻度が 5 % 以上であった 10 箇所の SNP に関して、Arlequin program を用

いてハプロタイプを推定する。この際、イントロン 3 から 3'非翻訳領域にかけて存在する完全連鎖平衡を示す SNP 群に関しては、そのうちの 1 つ、例えば「TAA+A2109G」を代表とすることができます。推定したハプロタイプを表 5 に示す。

5 表 5 健常人における  $\mu$  オピオイド受容体遺伝子多型のハプロタイプ

No.	frequency	A118G	IVS2 +G691C	IVS3 +G5807A	IVS3 +G5953A	IVS3 +A6151G	IVS3 +A8449G	IVS3 +C8497T	TAA +A2109G	TAA +A2274G	TAA +G2287A
1	4.9%	A	C	A	G	G	A	C	A	A	A
2	3.0%	A	C	G	G	G	A	C	A	A	A
3	24.6%	A	C	G	G	G	A	T	A	A	A
4	6.5%	A	G	G	A	G	A	C	A	G	A
5	5.4%	A	G	G	G	A	G	C	G	A	G
6	35.9%	G	C	A	G	G	A	C	A	A	A
7	3.6%	G	C	G	G	G	A	T	A	A	A
8	16.1%										
27 haplotypes with lower frequencies less than three percents											
sum	100.0%										

10

15

健常人におけるミューオピオイド受容体遺伝子多型のハプロタイプは 34 ハプロタイプが推定され、そのうち 3 % の高頻度でみられるものは 7 ハプロタイプあり、3 % 以下の頻度で起こることが推定される 27 のハプロタイプについて、表 5 の No.8 にまとめて表記している。

20 次に、上記ハプロタイプ頻度をもとにして、連鎖不平衡解析を行う。連鎖不平衡の尺度を示す値である  $D'$  値及び  $r^2$  値は、以下の定義に基づき算出することができる。

定義：

25 SNP A と SNP B とがあり、それぞれの allele を A,a と B,b とする。SNP A と SNP B とが作る 4 haplotypes を AB, Ab, aB, ab とし、それぞれの haplotype 頻度を  $P_{AB}$ ,  $P_{Ab}$ ,  $P_{aB}$ ,  $P_{ab}$  とすると、

$$D = P_{AB} \times P_{ab} - P_{Ab} \times P_{aB}$$

( $D > 0$  のとき)

$$D' = (P_{AB} \times P_{ab} - P_{Ab} \times P_{aB}) / \text{Minimum}((P_{AB} + P_{aB}) \times (P_{aB} + P_{ab})), ((P_{AB} + P_{Ab}) \times$$

$(P_{Ab} + P_{ab}))$

$(D < 0)$  のとき

$D' = (P_{AB} \times P_{ab} \cdot P_{Ab} \times P_{aB}) / \text{Minimum}(((P_{AB} + P_{aB}) \times (P_{AB} + P_{Ab})), ((P_{aB} + P_{ab}) \times (P_{Ab} + P_{ab})))$

5  $r^2 = (P_{AB} \times P_{ab} \cdot P_{Ab} \times P_{aB})^2 / \{(P_{AB} + P_{Ab})(P_{AB} + P_{aB})(P_{aB} + P_{ab})(P_{Ab} + P_{ab})\}$

[但し、 $\text{Minimum}(((P_{AB} + P_{aB}) \times (P_{aB} + P_{ab})), ((P_{AB} + P_{Ab}) \times (P_{Ab} + P_{ab})))$  は、 $(P_{AB} + P_{aB}) \times (P_{aB} + P_{ab})$  と  $(P_{AB} + P_{Ab}) \times (P_{Ab} + P_{ab})$  の内、値の小さい方をとることを意味する。]

10 表 6 は、健常人におけるミューオピオイド受容体遺伝子多型間の連鎖不平衡を示す一例である。

表 6 健常人における  $\mu$  オピオイド受容体遺伝子多型間の連鎖不平衡  
 $D'$

Locus	A118G	IVS2 +G691C	IVS3 +G5807A	IVS3 +G5953A	IVS3 +A6151G	IVS3 +A8449G	IVS3 +C8497T	TAA +A2109G	TAA +A2274G	TAA +G2287A
A118G		0.795	0.704	0.626	0.866	0.884	0.633	0.875	0.458	0.890
IVS2 +G691C	0.125		1.000	0.714	0.746	0.795	0.775	0.772	0.672	0.795
IVS3 +G5807A	0.453	0.134		0.921	0.849	0.883	0.895	0.868	0.535	0.883
IVS3 +G5953A	0.052	0.341	0.102		0.023	0.009	1.000	0.034	0.742	0.009
IVS3 +A6151G	0.054	0.201	0.047	0.000		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
IVS3 +A8449G	0.069	0.284	0.063	0.000	0.001		1.000	1.000	1.000	0.967
IVS3 +C8497T	0.159	0.062	0.291	0.069	0.037	0.046		1.000	0.763	1.000
TAA +A2109G	0.061	0.241	0.055	0.001	0.892	0.901	0.042		1.000	1.000
TAA +A2274G	0.024	0.266	0.030	0.484	0.011	0.014	0.035	0.014		1.000
TAA +G2287A	0.070	0.284	0.063	0.000	0.800	0.934	0.046	0.989	0.014	

連鎖不平衡解析の結果、 $D'$  値（表右上）が有意且つ 0.7 以上を示す多型の組み合わせを、下線で表し、さらに  $r^2$  値（表左下）も有意且つ 0.5 以上である組み合わせに関しては、太斜字で表している。

表 6 において、上から順に A118G を「SNP1」、IVS+G691C を「SNP2」、…、TAA+G2287A を「SNP10」とすると、SNP1 と SNP2 との連鎖不平衡を計算し、

その値を SNP1 の行と SNP2 の列の交わったセル（表右上側）に記している。連鎖不平衡の指標  $D' > 0.7$  以上の値を下線で示している。また、連鎖不平衡のより厳しい指標である  $r^2$  値においても同様に計算し、SNP1 の行と SNP2 の列の交わったセル（表右下側）に記す。

5 表 6 の **D'**に着目すると、IVS3+G5953A と TAA+A2274G を除き、全ての SNP の組み合わせにおいて、有意な連鎖不平衡が確認されている。また、 $r^2$  値に着目すると、イントロン 3 と 3' 非翻訳領域の 3 つの SNP において有意な連鎖不平衡が確認でき、そのうちの 1 つは TAA+A2109G である。

10 また、本発明においては、繰り返し多型と各 SNP の連鎖不平衡を解析することもできる。例えば表 3 に示す繰り返し多型は多様性を示すが、表 6 に示す 10SNP の全てとの間で有意な連鎖不平衡を確認することができた ( $P < 0.05$ )。

15 さらに、本発明においては、連鎖不平衡解析を行った結果（表 6）から 4 つのハプロタイプブロックを推定することができる。ハプロタイプブロックは、ハプロタイプ解析の結果から、例えば、HaploBlockFinder Version 0.6 を用いて連鎖ブロックを推定することができる（<http://cgi.uc.edu/cgi-bin/kzhang/haploBlockFinder.cgi>）。

20 この推定により、表 6 の SNP は、A118G を含むブロック、IVS2+G691C と IVS3+G5807A を含むブロック、IVS3+G5953A を含むブロック及び IVS3+A6151G 以降の SNP からなるブロックの 4 つのハプロタイプブロックに分類することができる。

25 推定されたハプロタイプブロック中の特定の SNP を調べると、間接的に同一ブロック内で連鎖している SNP の情報を知ることができる。つまり、 $\mu$  オピオイド受容体の遺伝子多型を調べる際に、すべての SNP を解析する必要はなく、特定のいくつかの SNP についてのみタイピングを行えばよい。

#### 4. $\mu$ オピオイド受容体遺伝子多型と薬物感受性との相関

$\mu$  オピオイド受容体の遺伝子に多型が生じると、 $\mu$  オピオイド受容体発現量や機能が変化すると考えられる。従って、 $\mu$  オピオイド受容体遺伝子多型と、 $\mu$  オ

ピオイド受容体に関するさまざまな表現型とは相関関係にある場合がある。ここで、表現型とは、疾患の発症に関する表現型と、薬物の感受性に関する表現型とを挙げることができる。疾患の発症に関する表現型としては、疼痛感受性、薬物依存への脆弱性等が挙げられ、薬物の感受性に関する表現型としては、薬物の有効性、薬物の副作用、薬物の有効持続期間等が挙げられる。

5  $\mu$ オピオイド受容体遺伝子多型と、表現系との相関は以下のように調べることができる。 $\mu$ オピオイド受容体遺伝子多型は、健常人における連鎖不平衡解析・ハプロタイプ解析の結果、推定された連鎖ブロック内の代表的な多型、例えば SNP を選択する。次に、被験（患者）個体におけるこの多型（例えば SNP）についての多型頻度を解析し、健常人の多型頻度との比較を行う。比較においては  $\chi^2$  乗検定などの統計手法を用いることが有効である。

10 表現系又は症状が覚醒剤精神病様症状の場合、例えば、覚醒剤の使用開始から妄想・幻覚を発症するまでの期間、使用停止後に妄想・幻覚が持続する期間、再燃性の有無、多剤乱用の有無で分類できる。そして、各分類毎に、健常人と対象者15 の多型頻度や遺伝子型を比較する。その結果、対照群と多型頻度に有意差のあった多型は、疾患へのかかりやすさや、薬物感受性の差を評価するのに用いることができる。ただし、遺伝子多型の傾向は、人種や出身地等に影響されることが示唆されているため、関連する多型（例えば SNP）を見出すのに用いた母集団と同様な遺伝子多型を示す集団において、当該多型を用いる上記評価を行うことが望20 ましい。

## 5. 解析結果の利用

上記のように解析された結果は、 $\mu$ オピオイド受容体に関するさまざまな薬物の感受性を予測する方法、 $\mu$ オピオイド受容体に関する疾患の治療又は予防法を選択する方法、又は治療用の薬物の適正投与量を決定する方法、副作用を予測する方法などの指標として利用することができる。なお、本発明のオリゴヌクレオチド又はマイクロアレイを用いて個々人の遺伝子型を判定することにより、薬物感受性を予測評価することが可能となる。

$\mu$ オピオイド受容体に関する薬物（機能修飾薬）としては、メタンフェタミン

等の覚醒剤、ドパミン受容体作動薬、ドパミン受容体拮抗薬、 $\mu$ 、 $\kappa$ 、 $\delta$ オピオイド受容体作動薬、 $\mu$ 、 $\kappa$ 、 $\delta$ オピオイド受容体拮抗薬、アルコール等を挙げることができる。例えば、メタンフェタミン、メチレンジオキシメタンフェタミン、アンフェタミン、デキストロアンフェタミン、ドパミン、モルヒネ、DAMGO、

5 コデイン、メサドン、カルフェンタニール、フェンタニール、ヘロイン、コカイン、ナロキソン、ナルトレキソン、ナロルフィン、レバロルファン、ペンタゾシン、ブプレノルフィン、オキシコドン、ヒドロコドン、レボルファノール、エトルフィン、ジヒドロエトルフィン、ヒドロモルホン、オキシモルホン、エタノール、メタノール、ジエチルエーテル及びトラマドール等を挙げることができる。

10 また、本発明の遺伝子多型又は方法を用いて、人種の違いによる薬物の感受性等を評価することが可能である。対象者は特に限定されるものではなく、日本人、欧米人などが挙げられるが、本発明においては日本人又は日本人と同様の遺伝子多型傾向を有する者であることが好ましい。

15 ところで、モルヒネは鎮痛薬として用いられるが、呼吸抑制作用も有するために、その投与用量の決定は、慎重に行う必要がある。本発明により明らかとなつた新規遺伝子多型とモルヒネ感受性との相関を解析し、どの多型を有する個体がどのようなモルヒネ感受性を有するのかを予め定めておくと、モルヒネ投与対象患者の $\mu$ オピオイド受容体遺伝子多型を調べることで、当該患者のモルヒネ感受性を明らかにして投与量を決定することができる。

20 被験対象者からのゲノムサンプルは、血液、唾液、皮膚等から抽出することができるが、ゲノムサンプルを採取できるものであれば、これに限定されるものではない。ゲノムDNAの抽出及び精製法は周知である。例えば、ヒトから採取した血液、唾液、皮膚等の検体から、フェノール法等を用いてゲノムDNAを精製する。その際、GFX Genomic Blood DNA Purification Kit等の市販のゲノムDNA抽出キットや装置を用いてもよい。調査するSNPがオープンリーディングフレーム中にある場合は、ゲノムDNAの代わりにmRNAやtotal RNAを抽出してもよい。以下、上記の被験サンプルの遺伝子多型検出法の一例を示す。

25

#### (1) PCR法を用いた検出

PCRにより被験サンプルを増幅するには、Fidelityの高いDNAポリメラーゼ、

例えば、KOD Dash ポリメラーゼ（TOYOBO 社）を用いることが好ましい。用いるプライマーは、被験サンプル中の対象 SNP を增幅できるようにプライマーの任意の位置に遺伝子多型が含まれるように設計し合成する。

增幅反応終了後は、増幅産物の検出を行い、多型の有無を判定する。

5 (2) 塩基配列決定法による検出

本発明においては、ジデオキシ法に基づく塩基配列決定法により本発明の多型を検出することもできる。塩基配列決定に用いるシークエンサーには、市販の ABI シリーズ（アマシャムバイオサイエンス）を用いる。

10 (3) DNA マイクロアレイによる検出

DNA マイクロアレイは、支持体上にヌクレオチドプローブが固定されたものであり、DNA チップ、Gene チップ、マイクロチップ、ビーズアレイなどを含む。

まず、被験サンプルのポリヌクレオチドを単離し、PCR により増幅し、蛍光レポーター基により標識する。続いて、標識化 DNA/mRNA, total RNA をアレイと共にインキュベートする。次にこのアレイをスキャナーに差し込み、ハイブリダイゼーションパターンを検出する。ハイブリダイゼーションのデータは、プローブアレイに結合した（すなわち標的配列に取り込まれた）蛍光レポーター基からの発光として採集する。標的配列と完全に一致したプローブは、標的配列と一致していない部分を有するものよりも強いシグナルを生じる。アレイ上の各プローブの配列及び位置は分かっているため、相補性によって、プローブアレイと反応させた標的ポリヌクレオチドの配列を決定することができる。

20 (4) TaqMan PCR 法による検出

TaqMan PCR 法は、蛍光標識したアレル特異的オリゴと Taq DNA ポリメラーゼによる PCR 反応とを利用した方法である。TaqMan PCR 法で用いるアレル特異的オリゴ(TaqMan プローブという)は、前記遺伝子多型情報に基づいて設計することができる。

25 (5) インベーダー法による遺伝子多型の検出

インベーダー法は、アレル特異的オリゴと鑄型とをハイブリダイゼーションすることにより遺伝子多型を検出する方法である。インベーダー法を行うためのキットは市販されており、この方法により容易に遺伝子多型を検出することが可能

である。

## 6. キット

本発明において、ミューオピオイド受容体遺伝子多型（例えばSNP）部位を含むオリゴヌクレオチドは、遺伝子多型検出用キットに含めることができる。

本発明の遺伝子多型検出用キットは、本発明を実施するためには必要な1種以上の成分を含むものである。例えば、本発明のキットは、酵素を保存若しくは供給するためのもの、及び／又は遺伝子多型検出を実施するために必要な反応成分を含むものである。そのような成分としては、限定されるものではないが、本発明のオリゴヌクレオチド、酵素緩衝液、dNTP、コントロール用試薬（例えば、組織サンプル、ポジティブ及びネガティブコントロール用標的オリゴヌクレオチドなど）、標識用及び／又は検出用試薬、固相支持体、説明書などが挙げられる。また本発明のキットは、必要な成分のうちの一部のみを含む部分的キットであつてもよく、その場合には、ユーザーが他の成分を用意することができる。

本発明のキットは、上記オリゴヌクレオチドを支持体に固定したマイクロアレイとして提供することもできる。マイクロアレイは、支持体上に本発明のオリゴヌクレオチドが固定されたものであり、DNAチップ、Geneチップ、マイクロチップ、ビーズアレイなどを含む。

本発明のキットは、本発明において見出された遺伝子多型を含むオリゴヌクレオチドを含む。従って、薬物を患者等に使用する前（例えば手術前、癌性疼痛時等）に採血してミューオピオイド受容体遺伝子を単離し、この遺伝子をキット中のオリゴヌクレオチドと反応させて遺伝子型を判定する。判定された遺伝子型から薬物の種類又は用量などの投与計画が作成される。その結果、個人に合った薬物効果を得ることができ、オーダーメイド医療に有用となる。例えばモルヒネを使用する場合は、個人に合った鎮痛効果を得、また副作用を最低限に抑えることができる。

以下、本発明を実施例により詳細に説明するが、本発明は実施例に限定されるものではない。

## 〔実施例 1〕 SNP 解析及びハプロタイプ構築

## (1) 対象

本実施例は、薬物依存ゲノム解析研究グループ(Japanese Genetics Initiative for Drug Abuse(JGIDA))に所属する日本国内の精神病院(精神科)に入院中及び退院した、WHO の診断基準 ICD-10 DCR で F15.2 及び F15.5 を示す、メタンフェタミン依存患者 128 名(男性 99 名、女性 29 名、平均年齢  $35.9 \pm 1.0$  歳)、並びに、主に医療従事者で過去及び家族に薬物依存歴がなく、また精神疾患を患っていない、健常人 179 名(男性 139 名、女性 40 名、平均年齢  $34.6 \pm 1.5$  歳)を 10 対象に行った。

また、健常人での多型頻度の解析の結果、エクソン 1 及びインtron 2 において、これまでに報告されてきた多型頻度と非常に異なる頻度で SNP が観察されたため、この 2 領域に関しては、健常人サンプルをそれぞれ 34 名並びに 53 名追加して、解析を行った。

診断は、2 人の精神科医による問診と、病院の記録を含めた入手可能な全ての情報を基に行われた。また、依存患者のうち、統合失調症、器質精神症候群、並びに他の精神性疾患を患った経歴のある患者は除外した。

被験者は全て日本人であり、その出生及び居住地域は、北九州、瀬戸内、東海及び関東地方であった。

本実施例は、JGIDA に所属する各機関での倫理審査にて承認を得た後、全ての対象者に、ゲノムサンプルを今回の研究に用いることに対しての、文書による同意を得て行った。

## (2) 覚醒剤精神病様症状における症例分類解析

臨床情報を基にメタンフェタミン依存患者を分類して行った解析では、患者を 25 以下の 4 項目に関してグループに分け、解析を行った。

(A) Latency of psychosis (使用開始から妄想・幻覚が発症するまでの期間)

・3 年以内に発症 (n=54, 平均年数=0.83 年)

・3 年以上経過後に発症 (n=53, 平均年数=9.98 年)

(B) Prognosis of psychosis (使用停止後、妄想・幻覚が持続する期間)

- transient (n=72, 1ヶ月以内に消失)
- middle (n=17, 1ヶ月から6ヶ月で消失)
- prolong (n=26, 6ヶ月以上持続)

(C) Spontaneous relapse (再燃性の有(n=86)無(n=42))

5 (D) Poly drug abuse (多剤乱用)

- none (n=36, メタンフェタミンの単独乱用)
- easily accessible drug only (n=49, アルコール、シンナーに乱用歴)
- heavy (n=43, モルヒネ、ヘロイン、大麻などに乱用歴)

また、メタンフェタミン依存患者のうち、各項目に関して臨床情報が得られな

10 かつた患者は、本解析から除外した。

### (3) Genotyping

ゲノムサンプルは、各対象者より採取した血液検体から、通常のフェノール抽出法を用いて精製した。すなわち、全血に対して3倍量の溶血試薬 (0.1 mM EDTA、155 mM NH<sub>4</sub>Cl<sub>2</sub>) を加え、室温で10分間放置した後、遠心し、沈殿を再懸濁させた後に、Proteinase K処理、RNase処理を行い、遠心して得られた上清から、フェノール・クロロホルム抽出をし、さらにエタノール沈殿を経て、ゲノムDNAを調整した。ゲノムDNAを鑄型として、KOD Dash (TOYOBO、東京) を用いてPCR法を行い、エタノール沈殿にて精製後、シークエンス用の鑄型DNAとした。

20  $\mu$ オピオイド受容体遺伝子の5'側非翻訳領域 (5' UTR 並びに 5' flanking region) は、開始コドンより上流 5765 bpまでの領域を2つのPCR増幅(-5765 ~-2272、-2612~421)を行うことで、目的とする全域を増幅した。エクソン1、エクソン2-3 (イントロン2を含む)、エクソン4 (終止コドンより下流 2952 bpを含む)、さらにイントロン1及び3の一部は、それぞれ箇所別にPCR法によりDNA断片の増幅を行った (増幅領域は図1参照)。3'側非翻訳領域 (3' UTR 並び 3' flanking region) は、終止コドンより下流 13830 bpまでの領域を、4つのPCR増幅 (TAA+2004~6288、4980~10376、8292~12120、11260~14677)を行うことで、目的とする全域を増幅した。これらのPCR産物を鑄型として、Big Dye Terminator V3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction (アプライドバイ

オシステム、東京) を用いたシークエンス法により塩基配列を解読し、遺伝子多型の解析を行った。

まず初めに、健常人のゲノムサンプル 44 例を使用し、増幅した PCR 断片の全領域を、計 152 本のプライマーを用いて、 $\mu$  オピオイド受容体遺伝子上に高頻度で見られる多型を見いだした。次に全エクソン領域と、高い頻度 (Allelic frequency > 5%) で観察される多型を含む領域に関して、残りの健常人サンプル及びメタンフェタミン依存患者サンプルのゲノム DNA を用いて、 $\mu$  オピオイド受容体遺伝子の多型解析を行った。プライマーは、National Center of Biotechnology Information (Genbank Accessions no. NT-023451) にて公開されている遺伝子配列を参照にして、設計を行った。

#### (4) 統計解析

健常人とメタンフェタミン依存患者のサンプル間での多型頻度の有意差検定は、カイ二乗検定を用いて行った (有意水準  $\alpha = 0.05$ )。また、全ての多型に関して、サンプルの偏りを確認するために、カイ二乗検定を用いて Hardy-Weinberg (HW) 平衡の検討を行った。連鎖不平衡解析及びハプロタイプ解析においては、健常人 179 例とメタンフェタミン依存患者 128 例の遺伝子型情報を、Arlequin program (<http://anthro.unige.ch/arlequin> で入手) (Schneider S, Roessli D, Excoffier L. Arlequin 2000: a software for population genetics data analysis. Ver 2.000. Genetics and Biometry Lab, Dept of Anthropology Univ of Geneva.) を用いて解析した。そして、連鎖不平衡の尺度を示す値である  $D'$  値及び  $r^2$  値を、前記の定義に基づき算出した。

繰り返し多型における、健常人とメタンフェタミン依存患者サンプルの多型頻度の有意差は、モンテカルロ法を基に作製された CLUMP program (Sham PC, Curtis D. Monte Carlo tests for associations between disease and alleles at highly poly morphic loci. Ann Hum Genet, 59, 97-105, (1995)) を用いて行った。

ハプロタイプ解析の結果から、HaploBlockFinder Version 0.6 を用いて連鎖ブロックを推定した。

[実施例 2] 日本人ゲノムにおける  $\mu$  オピオイド受容体遺伝子多型の解析

μオピオイド受容体遺伝子多型を同定するため、日本人健常人のゲノム DNA を用いて、全エクソン領域、インtron領域の一部、さらに 3' 及び 5' の非翻訳領域に関して、PCR 増幅の後、配列の解読を行った。全エクソン領域及びインtron領域の一部については、図 1 のゲノム模式図下の 7 本の線で示した領域に 5 関して多型解析を行った。また、118G、IVS2+G691C、intron3 から 3' UTR 下流約 4 kbp 付近まで広範囲で見られる完全連鎖不平衡を示す SNP 群、並びに二塩基繰り返し多型 IVS3+6113 (GT)<sub>11-15</sub> (実施例 3) と 32 塩基繰り返し多型の IVS3+8761 (32bp)<sub>2-17</sub> (実施例 3) に関して、健常人サンプルの多型頻度から連鎖不平衡解析を行い、有意に連鎖不平衡の関係にある多型間での D' 値を図 1 中 10 に示した(P<0.05)。

解読を行った領域において、表 1 の 36 個、表 3 の 2 個の計 38 の新規遺伝子多型と、既に他人種を用いた研究にて報告されている 3 つの SNP(A118G, IVS2+G31A, IVS2+G691C)を、日本人ゲノム上に見いだした (前述の表 1)。

日本人で見られた表 1 の 39 の SNP のうち、transversion 変異が 37 で大半を 15 占め、transition 変異は 2 箇所(IVS2+G691C, TAA+G2395C)であった。また、これら全ての多型は、HW 平衡にあったことから、集めたサンプルに偏りがないことも確認された。本実施例の日本人のゲノム上では、5' 非翻訳領域にて 14 の SNP が確認されたが、これまでに同じ領域で報告されていた 24 の SNP は見られなかった。

20 さらに、A118G と IVS2+G691C の二つの SNP に関しては、その多型頻度(表 1 「Allelic frequency」)は、日本人ゲノムではそれぞれ 45.3%と 81.9%であり、これまで欧米人のゲノムを中心に報告されてきた多型頻度(表 1 「Reported Allelic frequency」)ではそれぞれ 7.5-25.8%と 42.5-53.3%であり、日本人ゲノムにおいて著明に高い頻度で観察された(Hoehe MR, Kopke K, Wendel B, Rohde 25 K, Flachmeier C, Kidd KK, et al. Sequence variability and candidate gene analysis in complex disease: association of mu opioid receptor gene variation with substance dependence. Hum Mol Genet, 9, 2895-908, (2000))。

また、他人種を用いた研究で以前に高い多型頻度で報告されていた、C17T などのその他の翻訳領域に存在する SNP も観察されなかった(Hoehe MR, Kopke

K, Wendel B, Rohde K, Flachmeier C, Kidd KK, et al. Sequence variability and candidate gene analysis in complex disease: association of mu opioid receptor gene variation with substance dependence. *Hum Mol Genet*, 9, 2895-908, (2000)、Bond C, LaForge KS, Tian M, Melia D, Zhang S, Borg L, et al. Single-nucleotide polymorphism in the human mu opioid receptor gene alters beta-endorphin binding and activity: possible implications for opiate addiction. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 9608-13, (1998)、Bergen AW, Kokoszka J, Peterson R, Long JC, Virkkunen M, Linnoila M, et al. Mu opioid receptor gene variants: lack of association with alcohol dependence. *Mol Psychiatry*, 2, 490-4, (1997)、Sander T, Gscheidel N, Wendel B, Samochowiec J, Smolka M, Rommelspacher H, et al. Human mu-opioid receptor variation and alcohol dependence. *Alcohol Clin Exp Res*, 22, 2108-10, (1998)、Gelernter J, Kranzler H, Cubells J. Genetics of two mu opioid receptor gene (OPRM1) exon I polymorphisms: population studies, and allele frequencies in alcohol- and drug-dependent subjects. *Mol Psychiatry*, 4, 476-83, (1999)、Franke P, Wang T, Nothen MM, Knapp M, Neidt H, Albrecht S, et al. Nonreplication of association between mu-opioid-receptor gene (OPRM1) A118G polymorphism and substance dependence. *Am J Med Genet*, 105, 114-9, (2001)、Shi J, Hui L, Xu Y, Wang F, Huang W, Hu G. Sequence variations in the mu-opioid receptor gene (OPRM1) associated with human addiction to heroin. *Hum Mutat*, 19, 459-60, (2002)、Schinka JA, Town T, Abdullah L, Crawford FC, Ordorica PI, Francis E, et al. A functional polymorphism within the mu-opioid receptor gene and risk for abuse of alcohol and other substances. *Mol Psychiatry*, 7, 224-8, (2002))。

また興味深いことに、イントロン3及び3'非翻訳領域に見られたSNPのうち、一部において多型がほぼ同時に観察され、連鎖不平衡解析においてD'値1.000を示した。そこで、この連鎖不平衡ブロックのサイズを検討するため、例数を減らし(3 genotypeに関して各5例ずつ)、終止コドン(TAA)より下流約14 kbpまで解析範囲を広げたところ、さらに新たに57の遺伝子多型を見いたしました。μ

オピオイド受容体遺伝子 3'非翻訳領域で見出した多型とその連鎖不平衡を前記表 2 に示した。

新たに見出した 57 遺伝子多型のうち 24 の遺伝子多型は、上述の連鎖不平衡にある多型群と同時に確認され、連鎖不平衡解析において  $D'$  値並びに  $r^2$  値が共に 5 1.000 を示す完全連鎖不平衡の関係にあった（表 2 中、「\*」印）。

〔実施例 3〕  $\mu$  オピオイド受容体遺伝子多型におけるハプロタイプ解析と連鎖不平衡解析

実施例 2 で見いだした多型のうち、多型頻度が 5%以上であった 10 箇所の SNP 10 に関して、Arlequin program を用いてハプロタイプを推定した（前記表 5）。ハプロタイプを推定する際、多型頻度が 5%以上である SNP のうち、intron 3 から 3' 非翻訳領域にかけて存在する完全連鎖不平衡を示す SNP 群に関しては、そのうちの一つ TAA+A2109G を代表とした。Arlequin program により、34 のハプロタイプが推定され、そのうち 3%以上の高頻度でみられるものは 7 ハプロタイプあった（表 5、No.1～7）。頻度が 3 %以下（残りの 27 ハプロタイプ、全体の 16.1%に相当）に関しては、N0.8 にまとめて示した。

上述の TAA+A2109G の G allele は、5 番のハプロタイプでのみ見られ、他のいくつかの SNP も同様の傾向があった。

次に、得られたハプロタイプ頻度を基に連鎖不平衡解析を行った（前記表 6）。表 6 では、連鎖不平衡解析の結果、 $D'$  値（表右上）が有意且つ 0.7 以上を示す多型の組み合わせを下線で表し、さらに  $r^2$  値（表左下）も有意且つ 0.5 以上である組み合わせに関しては太斜字で表した。上で定義したように  $D'$  値を算出したところ、IVS3+G5953A 又は TAA+A2274G に関わるいくつかの組み合わせを除き、全ての SNP の組み合わせにおいて、有意な連鎖不平衡が確認された（表 6）。

25 また、より厳しい指標である  $r^2$  値において、intron と 3' 非翻訳領域の 3 つの SNP において有意な連鎖不平衡が観察され、その 3 つの SNP のうちの 1 つは上述した完全連鎖不平衡を示す多型群の一つである TAA+A2109G であった（表 6）。

また、ハプロタイプ解析の結果から、4 つの連鎖ブロックが推定された。

さらに、 $\mu$  オピオイド受容体遺伝子上において、SNP 以外のいくつかの塩基繩

り返し多型を新たに見いだした。イントロン 3 内で、二塩基繰り返し多型 IVS3+6113(GT)<sub>11-15</sub>、及び 32 塩基の繰り返し多型 IVS3+8761(32bp)<sub>2-17</sub> が観察された（前記表 3）。

これらの繰り返し多型は非常に多様性があったものの、表 6 に示す 10 個の 5 SNP 全てとの間で有意な連鎖不平衡が確認された（P < 0.05）。

〔実施例 4〕  $\mu$  オピオイド受容体遺伝子多型とメタンフェタミン依存・覚醒剤精神病様症状との相関

10  $\mu$  オピオイド受容体遺伝子多型と、メタンフェタミン依存・覚醒剤精神病様症状との相関を検討するため、健常人における連鎖不平衡解析・ハプロタイプ解析の結果（実施例 3）より、5%以上の多型頻度で、推定された連鎖ブロック内の SNP を代表する 4 箇所の SNP(A118G, IVS2+G691C, IVS3+A6151G, IVS3+G8497T)を選択した。

15 まず、全メタンフェタミン依存患者における多型頻度を解析し、健常人の多型頻度との比較を行った（表 7）。

表 7 健常人とメタンフェタミン依存患者における  $\mu$  オピオイド受容体遺伝子多型の多型頻度の比較

Locus	健常人		メタンフェタミン依存患者				
	Genotypic data number	Allelic data allelic frequency	Genotypic data number	Allelic data allelic frequency	P value	P value	
A118G	A 67 (0.31) A/G 99 (0.46) G 47 (0.22) total 213	45.3%	A 233 (0.55) G 193 (0.45) total 426	A 49 (0.38) A/G 54 (0.43) G 25 (0.19) total 128	40.6% P = 0.43	A 152 (0.59) G 104 (0.41) total 256	P = 0.23
IVS2 +G691C	G 6 (0.03) G/C 72 (0.31) C 154 (0.66) total 232	81.9%	G 84 (0.18) C 380 (0.82) total 464	G 12 (0.09) G/C 43 (0.33) C 73 (0.57) total 128	73.8% P = 0.012	G 67 (0.26) C 189 (0.74) total 256	P = 0.011
IVS3 +A6151G	A 2 (0.01) G/A 23 (0.13) G 154 (0.86) total 179	92.5%	A 27 (0.08) G 331 (0.92) total 358	A 1 (0.01) G/A 26 (0.20) G 101 (0.79) total 128	89.1% P = 0.21	A 28 (0.11) G 228 (0.89) total 256	P = 0.15
IVS3 +C8497T	C 85 (0.47) C/T 76 (0.42) T 18 (0.10) total 179	31.3%	C 246 (0.69) T 112 (0.31) total 358	C 73 (0.57) C/T 42 (0.33) T 13 (0.10) total 128	26.6% P = 0.209	C 188 (0.73) T 68 (0.27) total 256	P = 0.21

表7は、健常人との比較で、有意に多型頻度が異なっていたもののみを記載した。メタンフェタミン依存患者において、IVS2+G691C の多型頻度は 73.8% あり、健常人の 81.9% と比較してその頻度は低く、遺伝子型 (genotype) は有意に異なっており (P=0.023 カイ二乗検定)、Allele 頻度の比較においても C allele 5 が多く、有意に健常人と異なっている (P=0.023 カイ二乗検定) ことが明らかとなつた。

また、IVS3+A8497G においても、メタンフェタミン依存患者において健常人よりも G allele の割合が高い傾向が確認された。

次に、上記の4 SNP について、メタンフェタミン依存患者の遺伝子多型情報から、Arlequin program を用いてハプロタイプを推定し (表8)、そのハプロタイプ頻度を基に連鎖不平衝解析を行い、健常人と比較した (表9)。

表8 健常人とメタンフェタミン依存患者における  $\mu$  オピオイド受容体遺伝子多型のハプロタイプ頻度の比較

	Control	MAP dependent	Haplotype					
			frequency	frequency	A118G	IVS2 +G691C	IVS3 +A6151G	IVS3 +C8497T
1	1.4%				A	C	A	C
2	0.2%				A	C	A	T
3	10.9%	11.0%			A	C	G	C
4	24.3%	23.2%			A	C	G	T
5	5.7%	10.9%			A	G	A	C
6	9.2%	12.7%			A	G	G	C
7	1.7%	1.5%			A	G	G	T
8	40.0%	37.8%			G	C	G	C
9	4.9%	1.8%			G	C	G	T
10	0.3%				G	G	A	T
11	1.5%	0.9%			G	G	G	C

表9 健常人とメタンフェタミン依存患者における  $\mu$  オピオイド受容体遺伝子多型間の連鎖不平衝の比較

D'

Locus	A118G	IVS2 +G691C	IVS3 +A6151G	IVS3 +C8497T
A118G		0.795 0.897	0.866 1.000	0.633 0.794
IVS2 +G691C	0.125 0.195		0.746 1.000	0.775 0.739
IVS3 +A6151G	0.054 0.084	0.201 0.346		1.000 1.000
IVS3 +C8497T	0.159 0.156	0.062 0.071	0.037 0.044	

表9において、連鎖不平衡解析の結果、D' 値（表右上）が有意且つ 0.7 以上を示す多型の組み合わせを、下線で表している。表の各組み合わせの、上の数値が健常人、下の数値がメタンフェタミン依存患者のゲノムにおける、連鎖不平衡解析の結果を表す。

5 表9は、健常人とメタンフェタミン依存患者における $\mu$ オピオイド受容体遺伝子多型間の連鎖不平衡解析の結果を示し、D' 値（表右上）が有意且つ 0.7 以上を示す多型の組み合わせを暗灰色で示す。表9の各組み合わせの上の数値が健常人、下の数値がメタンフェタミン依存患者のゲノムにおける結果を示す。また、4 SNP における連鎖不平衡解析では全ての組み合わせで D' 値は有意な値を示していた  
10 が、 $r^2$  値はいずれも有意な値を示さなかった（図9）。

健常人とメタンフェタミン依存患者間でハプロタイプ頻度に関して有意な差は見られなかった( $P=0.40$ )ものの、表8のハプロタイプ 5 番及び 6 番において、健常人と比較してメタンフェタミン依存患者の多型頻度が高い傾向を示した。この 5 番と 6 番の両ハプロタイプの違いは、intron 3 から 3' 非翻訳領域にかけて存在する完全連鎖不平衡を示す SNP 群のうちの一つである IVS3+A6151G の allele  
15 タイプのみの違いであった。

従って、他の薬物に対する依存並びに疼痛治療等においてさらなるハプロタイプ解析が有用な差を示す可能性があると言える。

## 20 [実施例 5] 覚醒剤精神病様症状における症例分類解析

本実施例では、健常人と、覚醒剤精神病様症状により分類したメタンフェタミン依存患者との間での $\mu$ オピオイド受容体遺伝子多型の多型頻度を比較した。

メタンフェタミン依存患者を、臨床情報を基に、覚醒剤精神病様症状の症例によって実施例 1 に記載したように分類し、解析を行った。解析は、実施例 3 の連鎖不平衡解析から推定される連鎖ブロックを代表する 4 箇所の SNP(A118G, IVS2+G691C, IVS3+A6151G, IVS3+G8497T)全てで行った。そのうち、有意に健常人と多型頻度が異なっている群が存在した多型のみを表 10 に記載した。

表10 健常人と覚醒剤精神病様症状により分類したメタンフェタミン依存患者間での $\mu$ オピオイド受容体遺伝子多型の多型頻度の比較

Locus	健常人		メタンフェタミン依存患者						
	例数	多型頻度	group 1	例数	多型頻度	group 2	例数	多型頻度	group 3
(1) 妄想・幻覚の発症時期		3年未満						3年以上	
5	A118G	A 67 (0.31) A/G 99 (0.46) 45.3% G 47 (0.22) total 213	25 (0.46) 24 (0.44) 31.5% 5 (0.09) 54	P= 0.0404	20 (0.38) 25 (0.47) 38.7% 8 (0.15) 53	P= 0.4691			
	IVS2 +G691C	G 6 (0.03) G/C 72 (0.31) 81.9% C 154 (0.66) total 232	6 (0.11) 20 (0.37) 70.4% 28 (0.52) 54	P= 0.0085	5 (0.09) 19 (0.36) 72.6% 29 (0.55) 53	P= 0.0394			
	IVS3 +A6151G	A 2 (0.01) G/A 23 (0.13) 92.5% G 154 (0.86) total 179	0 (0.00) 15 (0.28) 86.1% 39 (0.72) 54	P= 0.0269	1 0.019 7 0.132 91.5% 45 0.849 53	P= 0.9060			
	(2) 妄想・幻覚の持続期間		transient		middle		prolonged		
10	IVS2 +G691C	G 6 (0.03) G/C 72 (0.31) 81.9% C 154 (0.66) total 232	8 (0.11) 27 (0.38) 70.1% 37 (0.51) 72	P= 0.0034	0 (0.00) 5 (0.29) 85.3% 12 (0.71) 17	P= 0.7807	3 (0.12) 8 (0.31) 73.1% 15 (0.58) 26	P= 0.0596	
	(3) 再燃性の存在		not exist		exist				
	IVS2 +G691C	G 6 (0.03) G/C 72 (0.31) 81.9% C 154 (0.66) total 232	6 (0.07) 30 (0.35) 75.6% 50 (0.58) 86	P= 0.1250	5 (0.12) 14 (0.33) 71.4% 23 (0.55) 45	P= 0.0143			
	(4) 多剤乱用		none		easily accesible drug		heavy		
15	IVS2 +G691C	G 6 (0.03) G/C 72 (0.31) 81.9% C 154 (0.66) total 232	5 (0.14) 11 (0.31) 70.8% 20 (0.56) 36	P= 0.0059	3 (0.06) 15 (0.31) 78.6% 31 (0.63) 49	P= 0.4401	1 (0.02) 18 (0.42) 76.7% 24 (0.56) 43	P= 0.3801	
	IVS3 +C8497T	C 85 (0.47) C/T 76 (0.42) 31.3% T 18 (0.10) total 179	24 (0.67) 6 (0.17) 25.0% 6 (0.17) 36	P= 0.0137	24 (0.49) 22 (0.45) 28.6% 3 (0.06) 49	P= 0.6986	22 (0.51) 17 (0.40) 29.1% 4 (0.09) 43	P= 0.9104	
解析は健常人の連鎖不平衝解析から、推定される連鎖ブロックを代表する4箇所のSNP全てで行い、そのうち、有意に健常人と多型頻度が異なっている群が存在した多型のみを記載している。									

25 (1) 覚醒剤の使用開始から妄想・幻覚を発症するまでの期間で分類したところ、3年以内に発症した群において、健常人と比較して、3箇所のSNP (A118G, IVS2+G691C, IVS3+A6151G) の多型頻度が低い値を示し、遺伝子型が有意に異なっていた (それぞれ、P=0.040, P=0.0085, P=0.027)。IVS2+G691Cに関しては、メタンフェタミン使用開始から3年以上経過した後に、妄想・幻覚が

発症した群においても同様に、健常人と比較して有意に遺伝子型が異なっていた ( $P=0.039$ ) が、発症までの期間が短い群の方が、より大きく異なる傾向を示した。

5 (2) 覚醒剤の使用停止から妄想・幻覚が消失するまでの期間で分類したところ、1ヶ月以内に比較的速やかに消失した群において、IVS2+G691C の多型頻度が低い値を示し、健常人と比較して有意に遺伝子型が異なっていた ( $P=0.0034$ )。

(3) 再燃性の有無に関して分類した場合も、再燃性が見られた群において、同様に IVS2+G691C の多型頻度が低い値を示し、健常人と比較して有意に遺伝子型が異なっていた ( $P=0.014$ )。

10 (4) 多剤乱用を指標として分類し、解析を行ったところ、メタンフェタミンにのみ乱用歴があった群において、2箇所の SNP (IVS2+G691C, IVS3+C8497T) の多型頻度が低い値を示し、健常人と比較して有意に遺伝子型が異なっていた ( $P=0.0059$ 、 $P=0.014$ )。

15 日本人サンプルにおいて、翻訳領域に存在する多型は、エクソン 1 に存在し、アスパラギンがアスパラギン酸に変化する A118G のみであった。このアスパラギンは、7回膜貫通型受容体である  $\mu$  オピオイド受容体の N 末端に存在する 5 箇所の glycosylation 部位のうちの 1 箇所と考えられている。

20 本実施例において、A118G の多型頻度は、健常人とメタンフェタミン依存患者との比較では、これまでの報告と同様に有意な差は見られなかつたが（表 7）、メタンフェタミン依存患者を覚醒剤精神病様症状により分類した際に、いくつかの群で健常人と比較し有意に多型頻度が異なっていた（表 10）。

25 メタンフェタミン依存患者を臨床情報を基に分類し解析したところ、妄想・幻覚の発現時期、持続期間並びに再現性の有無において、いくつかの SNP で健常人と比較して有意に多型頻度が低い群が見られた。このことは、メジャー allele を持つ群の方が、メタンフェタミンによる覚醒剤精神病を発症し易いことを示している（表 10）。

本発明は、 $\mu$  オピオイド受容体の遺伝子多型、特に IVS2+G691C が、メタンフェタミン依存並びに覚醒剤精神病における脆弱性に関する有用な遺伝子マーカーの 1 つと考えられることを示している。また、 $\mu$  オピオイド受容体を介した作

用における様々な個人差には、翻訳領域以外の遺伝子多型による  $\mu$  オピオイド受容体発現に対する何らかの調節機構の違いが大きく寄与していることを示すものである。

## 5 産業上の利用可能性

本発明により、 $\mu$  オピオイド受容体遺伝子の新規多型が提供される。本発明の多型を用いることで、薬物に対する個人の感受性の差を評価することができる。この感受性評価方法により、モルヒネ等の麻薬性薬物の処方適正量を知ることが可能となる。

10

## 配列表フリーテキスト

配列番号 1 8 : n は ac の m 回の繰り返しを示す（存在位置 51）。

配列番号 2 7 : n は gt の 11~15 回の繰り返しを示す（存在位置 51）。

15 配列番号 3 1 : n は attatcatattatgacatatatcataatata の 2~17 回の繰り返しを示す（存在位置 51）。

配列番号 5 2 : n は a の m 回の繰り返しを示す（存在位置 51）。

配列番号 5 8 : n は 322bp の配列又は欠失を示す（存在位置 51）。

配列番号 6 0 : n は a 又は欠失を示す（存在位置 51）。

20 配列番号 6 6 : n は a の m 回の繰り返しを示す（存在位置 51）。

配列番号 7 4 : n は a の m 回の繰り返しを示す（存在位置 51）。

配列番号 8 1 : n は ca の m 回の繰り返しを示す（存在位置 51）。

配列番号 8 3 : n は tctc 又は欠失を示す（存在位置 51）。

配列番号 8 6 : n は ttcc の挿入を示す又は何も表さない（存在位置 51）。

25 配列番号 9 7 : n は t の m 回の繰り返しを示す（存在位置 51）。

## 請求の範囲

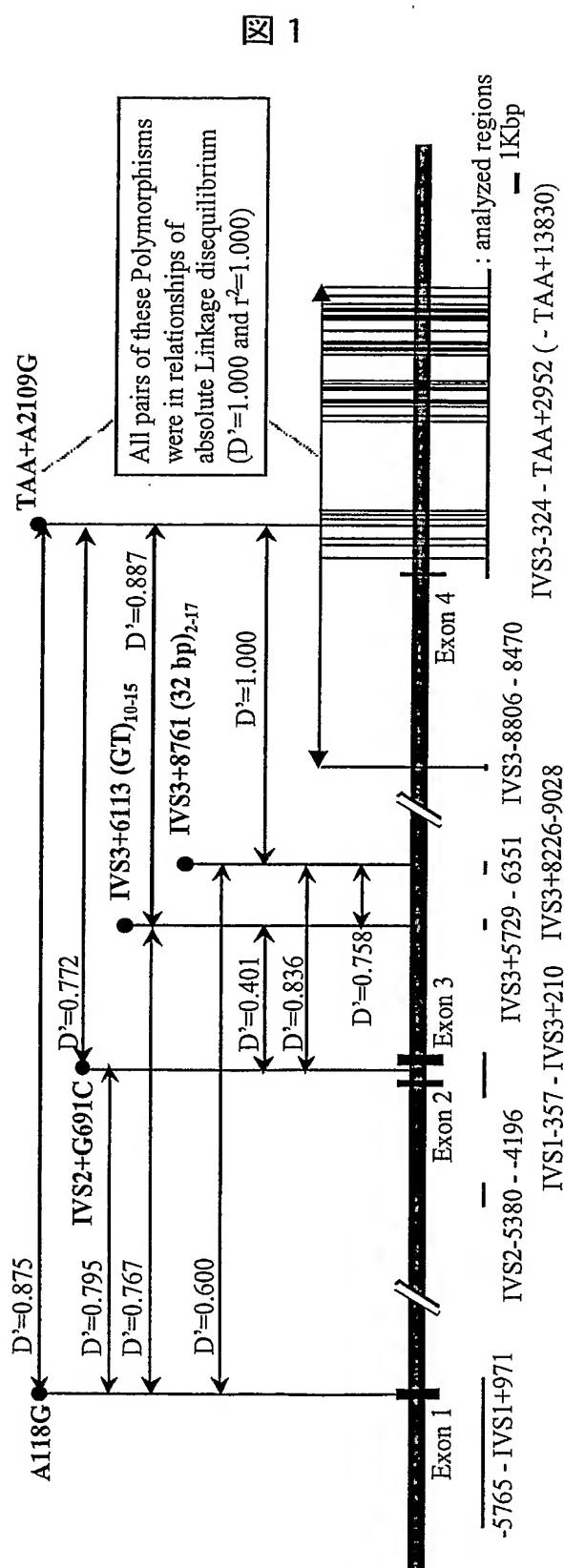
1. ミューオピオイド受容体遺伝子の遺伝子多型、又は当該遺伝子多型により構成されるハプロタイプと、個体の薬物感受性とを関連づけることを特徴とする、薬物感受性の評価方法。  
5
2. 薬物がミューオピオイド受容体機能修飾薬である請求項1記載の方法。
3. ミューオピオイド受容体機能修飾薬が、メタンフェタミン、メチレンジオキシメタンフェタミン、アンフェタミン、デキストロアンフェタミン、ドパミン、モルヒネ、DAMGO、コデイン、メサドン、カルフェンタニール、フェンタニール、ヘロイン、コカイン、ナロキソン、ナルトレキソン、ナロルفين、レバロルファン、ペントゾシン、ブプレノルフィン、オキシコドン、ヒドロコドン、レボルファノール、エトルフィン、ジヒドロエトルフィン、ヒドロモルホン、オキシモルホン、エタノール、メタノール、ジエチルエーテル及びトラマドールからなる群から選択される少なくとも1つである請求項2記載の方法。  
10
4. 遺伝子多型が、一塩基多型、インサーション型多型、デリーション型多型及び塩基繰り返し多型からなる群から選択される少なくとも1つである請求項1記載の方法。  
15
5. 遺伝子多型が表4に示されるものである請求項4記載の方法。
6. ハプロタイプが表5又は8に示されるものである請求項1記載の方法。  
20
7. 請求項1～6のいずれか1項に記載の方法により評価された結果を指標として、個体に投与する薬物の種類及び/又は量を決定する方法。
8. 請求項1～6のいずれか1項に記載の方法により評価された結果を指標として、個体に投与する薬物の副作用を予測する方法。  
25
9. 配列番号1～98に示すいずれかの塩基配列のうち第51番目の塩基を含む少なくとも10塩基の配列又はこれに相補的な配列からなるオリゴヌクレオチド。  
10. 10～45塩基の長さを有する請求項9記載のオリゴヌクレオチド。  
11. 配列番号1～98に示す塩基配列又はこれに相補的な塩基配列からなる群

から選択されるオリゴヌクレオチド。

12. 請求項9～11のいずれかに記載のオリゴヌクレオチドが支持体に固定されたマイクロアレイ。

13. 請求項9～11のいずれかに記載のオリゴヌクレオチド及び／又は請求項

5 12記載のマイクロアレイを含む、薬物感受性評価用キット。



## SEQUENCE LISTING

<110> Tokyo Metropolitan Organization for Medical Research

<120> A method of evaluating drug sensitivity with analyses of mu opioid receptor gene

<130> PCT05-0031

<150> JP2004-106136

<151> 2004-03-31

<160> 98

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 101

<212> DNA

<213> Homo Sapiens

<400> 1

gttcaactgc taataacctta gcaggaatcg aaacagtgc cccatggcat rctaagagtc 60

actgtactct tcacagacgt gcactcacag aagaaaaaca c 101

<210> 2

<211> 101

<212> DNA

<213> Homo Sapiens

<400> 2

actaaaagtag aatgcttgtc ccaaagaaaa gcgcattttg cctgttttag ytgtgaacta 60

aattaaccac ttttccgtg gatcactatt tttatataa g 101

<210> 3

<211> 101

<212> DNA

<213> Homo Sapiens

<400> 3

atgttgcctg tttgagctgt gaactaaatt aaccactttt tccgtggatc rctattttta 60

tttaaagaat gactgaggcc gggcgcggtg gctcacgcct g 101

<210> 4

<211> 101

<212> DNA

<213> Homo Sapiens

<400> 4

ctgaggccgg gcgcgggtggc tcacgcctgt aatcccagca ctttgggagg ytgaggcagg 60

cagatgacga ggtcaggaga tcgagaccat cctggctaac a 101

<210> 5

<211> 101

<212> DNA

<213> Homo Sapiens

<400> 5

actcgggagg tggagcttgc agcgagctga gatcgccca ctgcactcca rcctggcga 60

cagagtgaga ctctgtttta aaataaataaa ataaataaaaa t 101

<210> 6

<211> 101

<212> DNA

<213> Homo Sapiens

<400> 6  
ataaataaaaa taaaatataa tgataaagaa atgttttat agagctctca rtttaattt 60  
ctgaagtgtat agactgtgtat aaagataacc taaataagaa a 101

<210> 7  
<211> 101  
<212> DNA  
<213> Homo Sapiens

<400> 7  
taattcttct tgctaatttc taggccacat acaacaggat ataaaaagcc maacaacaaa 60  
ggataaaattc tttcatatgt gtgtaatcct ataaaccctc t 101

<210> 8  
<211> 101  
<212> DNA  
<213> Homo Sapiens

<400> 8  
taaaaatataat gctaattcatt tttcaactg aattcaaata ttatgcacat kaatattcat 60  
atatgtttaa tatagaaaaga aacacagaga gtgagggagg g 101

<210> 9  
<211> 101  
<212> DNA  
<213> Homo Sapiens

<400> 9  
aaaatataatg ctaatcattt tttcaactga attcaaataat tatgcacatt matattcata 60  
tatgtttaat atagaaaagaa acacagagag tgagggagg a 101

<210> 10  
<211> 101  
<212> DNA  
<213> Homo Sapiens

<400> 10  
ctaatcattt tttcaactga attcaaatat tatgcacatt aatattcata yatgttaat 60  
atagaaaagaa acacagagag tgagggaggg agtccactat g 101

<210> 11  
<211> 101  
<212> DNA  
<213> Homo Sapiens

<400> 11  
aaaaatctat agtgttgtac tgagctccct ccaaagcaac tataaattta yaggagatga 60  
aacatatgat tcaccaggca taagaagaaa gtttccgtaa t 101

<210> 12  
<211> 101  
<212> DNA  
<213> Homo Sapiens

<400> 12  
tccacatgaa ctaagcacaa aggaactgaa tgcagggaga cagatttcag ytcaatataa 60  
gagaattgtt acattagttc atggaagaat atgtttaag g 101

<210> 13  
<211> 101  
<212> DNA  
<213> Homo Sapiens

<400> 13  
tgtttctcat ttcttttca gaaaataaaag gatcgctgtt gttcccaaca kgttttagg 60  
gaagaaaatt ggagaaaacat tattaccttt tcttagatgt t 101

<210> 14  
<211> 101  
<212> DNA  
<213> Homo Sapiens

<400> 14  
tagggttca tcaagccaaat gtattccctg ccagattta aggagaaaaa kgcgctggaa 60  
aattgagtga tggtagcccc ctttcttatt tttcactgct a 101

<210> 15  
<211> 101  
<212> DNA  
<213> Homo Sapiens

<400> 15  
ccccagcacc cagccccgt tcctgggtca acttgtccca ctttagatggc racctgtccg 60  
accatgcgg tccgaaccgc accgacctgg gcgggagaga c 101

<210> 16  
<211> 101  
<212> DNA  
<213> Homo Sapiens

<400> 16  
aatgaaaagg cagaaaaatt agccccaaaa gagatgaaac tcttccgtcc rtcaccattg 60  
actctattgt gaacttatga aaaaggtagt tgagcaatat g 101

<210> 17

<211> 101

<212> DNA

<213> Homo Sapiens

<400> 17

gaaccttatga aaaaggtagt tgagcaatat gaaggccatg atgtggatt raacacacac 60

acacacacac acacacacac acacacatgc tggattctaa a 101

<210> 18

<211> 101

<212> DNA

<213> Homo Sapiens

<220>

<221> misc\_feature

<222> (51)..(51)

<223> n represents m repeats of ac

<400> 18

acttatgaaa aaggtagttg agcaatatga aggccatgat gtggattaa natgctggat 60

tctaaaatgt gtccttcctc ctctcactct cttgatcgt t 101

<210> 19

<211> 101

<212> DNA

<213> Homo Sapiens

<400> 19

acagaggtaa tttatTTAGT ctggcttcac ttaacacaaa taggtcaaaa rcaatcacat 60

tttgtaagta gtaatagttg gagaaatgtg tgaagaatag g 101

<210> 20

<211> 101

<212> DNA

<213> Homo Sapiens

<400> 20

ggtcaaaaga taaataagaa ttattttata accataagaa aggaagaaca kctataaaca 60

aaagtcataat atgcaacata aaagaatagg tgagctgcc a g 101

<210> 21

<211> 101

<212> DNA

<213> Homo Sapiens

<400> 21

ttctggaagt tccataaaaaa tcactcta at gggtaaaca tcgatggttc kcagaagaac 60

acaatttttt tcaaaaacga atagcattgt aaattcattt a g 101

<210> 22

<211> 101

<212> DNA

<213> Homo Sapiens

<400> 22

tacaacaaaa tacaggcaag gtgagtgtg ttaccagcct gagggaaagg rggttcacag 60

cctgatatgt tggtgatgtc ataagcaaag cagtattt a g 101

<210> 23

<211> 101

<212> DNA

<213> Homo Sapiens

<400> 23

tttatatcaa tatagacctc atggaggatc tagctcatgt tgagaggttc rttttgttc 60

cctgaacgaa agcttaatgt gatcgaagtg gactgcaaaa t 101

<210> 24

<211> 101

<212> DNA

<213> Homo Sapiens

<400> 24

ttccacaatt tctttatagc cttaagttag ctctggtcaa ggctaaaaat saatgagcaa 60

aatggcagta ttaacacacctt atgacataat taaatgttgc t 101

<210> 25

<211> 101

<212> DNA

<213> Homo Sapiens

<400> 25

ctctaattac tattattaaa gcactttctt gacattttaa tcaaaatagc rggtaagaa 60

gttaggagat gctctgtatt tggtttaact gtgaactata t 101

<210> 26

<211> 101

<212> DNA

<213> Homo Sapiens

<400> 26

acatcactct caaaagttga tctcagttt ttttacaaga catctgtgga ragttaattt 60

gggaaagtaa ttgtttcaat tcaatggaa aaaaaactca a

101

<210> 27

<211> 101

<212> DNA

<213> Homo Sapiens

<220>

<221> misc\_feature

<222> (51)..(51)

<223> n represents 11 to 15 repeats of gt

<400> 27

atcaaaatgg ctattcttc agttctacag tttaaaaaga aaatggttcc ngcgtgtat 60

ataggcatgt ctcttttgc atgtatggaa ttagagtaaa t 101

<210> 28

<211> 101

<212> DNA

<213> Homo Sapiens

<400> 28

aaagaaaatg gttccgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtgcg tgtgatatacg rcatgtctct 60

ttttgcatgt atgaaattag agtaaatgta gtttaaaat t 101

<210> 29

<211> 101

<212> DNA

<213> Homo Sapiens

<400> 29

tgatatatat cataacatat tataattat attatgatat atatcataac rtgtattatc 60  
atattatgt atatatcata acatatatat tatcatatta c 101

<210> 30  
<211> 101  
<212> DNA  
<213> Homo Sapiens

<400> 30  
acatgttatta tcattattatg atatatatca taacatatat attatcatat yacgatatat 60  
atcataacat attatatatt atcatattat gatatatatc a 101

<210> 31  
<211> 101  
<212> DNA  
<213> Homo Sapiens

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (51)..(51)  
<223> n represents 2 to 17 repeats of attatcatattatgacatatatcataatata

<400> 31  
tatgacatat cataatatat attatcatat tatgacatat cgtaatatat natcaaaaag 60  
tcacagagct catgcaagcc cagtcatccc cattgccagt g 101

<210> 32  
<211> 101  
<212> DNA  
<213> Homo Sapiens

<400> 32  
aatatatatt atcatattat gacatatatc ataatatata ttatcatatt rtgacatata 60

tcataatata tatcaaaaag tcacagagct catgcaagcc c 101

<210> 33

<211> 101

<212> DNA

<213> Homo Sapiens

<400> 33  
taaaatgtac tctttatttc tcactggttt ctccatactg caggctcccc rcatattatt 60

ttctttttt aactcagctc agaattcctta tgcctttga a 101

<210> 34

<211> 101

<212> DNA

<213> Homo Sapiens

<400> 34  
atctaggtag acagccaagt cagatggccc atgcctagaa gctctccatt ytgaactttt 60

gtcagcattt attaaaagaa tcaaataacct tgtagttatc t 101

<210> 35

<211> 101

<212> DNA

<213> Homo Sapiens

<400> 35  
cagccaagtc agatggccca tgcctagaag ctctccattt tgaacttttgc ycagcattga 60

ttaaaaagaat caaataacctt gtagttatct atgatgatac a 101

<210> 36  
<211> 101  
<212> DNA  
<213> Homo Sapiens

<400> 36  
ttatgtggac tcaaccacg tatccagtag atggaaaaaa acaaaagcca raataagttt 60  
tttagtgttt ccttctgatg aagtttcatg tttgcttgta a 101

<210> 37  
<211> 101  
<212> DNA  
<213> Homo Sapiens

<400> 37  
aacaaaagcc aaaataagtt ttttagtgtt tccttctgat gaagtttcat rtttgcttgt 60  
aataatctcc atttctcaa tattatgttc cataatagac a 101

<210> 38  
<211> 101  
<212> DNA  
<213> Homo Sapiens

<400> 38  
atgctttca tgggcttagga tggtttctcc caagagatga catagtattt ytttgctca 60  
tcaggctgtt tctcagcaat cattgtttct gcttaataacc a 101

<210> 39  
<211> 101  
<212> DNA  
<213> Homo Sapiens

<400> 39

gctcctagta cgaattatct ggcatgttga gagcaacttt gtcttcaagt rggacctgat 60

ctatctttt ccacaaatgt catgtgttg aacaagtttc t 101

<210> 40

<211> 101

<212> DNA

<213> Homo Sapiens

<400> 40

attctaaagt aaataataaa taaggtcatt gtcaacgtt ttcattcaaa rccattttt 60

aacgtaaatt tgctagaacc accttccaat tccaggcaa g 101

<210> 41

<211> 101

<212> DNA

<213> Homo Sapiens

<400> 41

taataaaataa ggtcattgtc aacgttttc attcaaaacc atttttaac rtaaatttg 60

tagaaccacc ttcccaattcc aaggcaagga gagacattac a 101

<210> 42

<211> 101

<212> DNA

<213> Homo Sapiens

<400> 42

ctcaactgga tgggctaagg tttctgataa aatctgaaga taaagaaaat sgaatattct 60

gctttttct tccttctaat ttcacccttg cctaaggatg a 101

<210> 43

<211> 101

<212> DNA

<213> Homo Sapiens

<400> 43

ttttcttcc ttcttaatttc acccttgcct aaggatgaga tttcttccca sgttggatc 60

ccagaaatgc agactgttagc tatggggcgg aagctttgtt t 101

<210> 44

<211> 101

<212> DNA

<213> Homo Sapiens

<400> 44

ttgcctaagg atgagatttc ttcccaggtt ggtatcccag aaatgcagac ygtagctatg 60

ggcggaagc tttgttctt tacctgatca cttgctgtgg a 101

<210> 45

<211> 101

<212> DNA

<213> Homo Sapiens

<400> 45

atttcttccc aggttggtat cccagaaatg cagactgtag ctatggggcg raagcttgc 60

ttcttacct gatcacttgc tgtggaaatt ctagcttatt g 101

<210> 46

<211> 101

<212> DNA

<213> Homo Sapiens

<400> 46  
tcctctttc cttgccaatc attagaaagg aaagaagagg aaagagactc kctggagcac 60  
tggtagtct ctaggaccct gctatcctat cccaacaggg c 101

<210> 47

<211> 101

<212> DNA

<213> Homo Sapiens

<400> 47  
actggtagt ctcttaggacc ctgctatcct atcccaacag ggctgtcaga mggagaactc 60  
ctaatgtggc catttcaaac acttctcaac attgaaatag a 101

<210> 48

<211> 101

<212> DNA

<213> Homo Sapiens

<400> 48  
gaagtttaa aataacctct tctaagacac ggctatgagt aggtaagaga kcattcattc 60  
ccttcaataa tatgactgtg ttgataaaac tgataaccat t 101

<210> 49

<211> 101

<212> DNA

<213> Homo Sapiens

<400> 49

aactgataac cattcacttg caaatgttat tattgaataa gtctcactta kctcattaa 60

tattacccaa aagatgctaa caaattctgt ttcccacatt g 101

<210> 50

<211> 101

<212> DNA

<213> Homo Sapiens

<400> 50

gccaaagcaa cctaagaata ggacatggta gcttaagttt ttcagcttct yaactggcca 60

cacacacaca agttgtgttt gtacaattct tgaggtcaat c 101

<210> 51

<211> 101

<212> DNA

<213> Homo Sapiens

<400> 51

caaacaatat tactgtgttc taagcgcttc tgttactcga aaggggtctg rtccagaccc 60

caaaaagaggg ttcttggacc tcatgcaaga aagaattcag g 101

<210> 52

<211> 101

<212> DNA

<213> Homo Sapiens

<220>

<221> misc\_feature

<222> (51)..(51)

<223> n represents m repeats of a

<400> 52

ggtttgtttt aagtaagcca ct当地ctccc tgcaagttcc cacggagcag nggaggaaac 60

ttttcctgg gagccacta atcacacagt gaacaaaagg c 101

<210> 53

<211> 101

<212> DNA

<213> Homo Sapiens

<400> 53

taagaaagca aaggaataaa gaatggctac tccataggca gcgttagcccc magggctgct 60

ggttggctat ttttgggtt atttcttgat tatatgctaa a 101

<210> 54

<211> 101

<212> DNA

<213> Homo Sapiens

<400> 54

gtcgctctgg ttcaaaccacc tctgacactt gaattacaaa tataaggacc rttgacactg 60

agatttaag ggagggaaaaa cagattgaca gtggactaaa g 101

<210> 55

<211> 101

<212> DNA

<213> Homo Sapiens

<400> 55

gcaaggtaag aatcaagtag aatgataaa gggcaaggaa aaaagatgaa mgcttactca 60

tattaaccat tctaccattg gaattatttg ccaacacacc t 101

<210> 56

<211> 101

<212> DNA

<213> Homo Sapiens

<400> 56

gacagtgggg aaaattcatc ttcatattgt cacatgcact gtaataggaa kgtttagcaa 60

aaaaaacctt ccagagaaag gtgggttcca atattaccta c 101

<210> 57

<211> 101

<212> DNA

<213> Homo Sapiens

<400> 57

gcaaaaaaaaaa cttccagag aaaggtggtt tccaatatta cttacaactt sctttgcaat 60

ttgattttt aaggaccta aaagttgaaa acaggctatc a 101

<210> 58

<211> 101

<212> DNA

<213> Homo Sapiens

<220>

<221> misc\_feature

<222> (51)..(51)

<223> n represents a sequence having 322bp or deletion

<400> 58

taaatgtttt attaagttt gcattgccca ctaaggctag acatttttt ngataaaatc 60

acagggttac aaaataccaa acggaaatga gataagtgg a 101

<210> 59

<211> 101

<212> DNA

<213> Homo Sapiens

<400> 59

ggcccggtca gacatTTTT gataaATTCA cagggttaca aaataccaaa yggaaatgag 60

ataagtggta taaaccacag aagatataagg agaagagaaa a 101

<210> 60

<211> 101

<212> DNA

<213> Homo Sapiens

<220>

<221> misc\_feature

<222> (51)..(51)

<223> n represents a or deletion

<400> 60

tgagataagt ggtataaaacc acagaagata taggagaaga gaaaaaaaaa ngaggaaata 60

aagaagacaa ctctttcct aagagtctgg gtAAAATTGA a 101

<210> 61

<211> 101

<212> DNA

<213> Homo Sapiens

<400> 61

ggAAATAAAG aagacaactc tttcctaag agtctggta aaattGAACA yAGCCATATT 60

cactgaacaa catgagttag cttcattaat ttaAGCACAG C 101

<210> 62  
<211> 101  
<212> DNA  
<213> Homo Sapiens

<400> 62  
ccatattcac tgaacaacat gagtgagctt cattaattta agcacagcaa ractgctta 60  
attnacaaga ccagagagaa gggagaggag actacatttg t 101

<210> 63  
<211> 101  
<212> DNA  
<213> Homo Sapiens

<400> 63  
gtgacatatt agacttctta ctttcccaa ataaaaaaagt gcctgctggg ycggtggct 60  
cacgcctgta attccagcac ttgggaggc cgaggcggc g 101

<210> 64  
<211> 101  
<212> DNA  
<213> Homo Sapiens

<400> 64  
gcgcgggtggc tcacgcctgt aattccagca ctttggagg ccgaggcggg ygaaacacaa 60  
ggtcaggaga tcaagaccat cctggccat atggtaaaac c 101

<210> 65  
<211> 101  
<212> DNA  
<213> Homo Sapiens

<400> 65

atacaaaaatt aggaaggcgt ggtgggtgcac gcctgtaatc ccagctagtc rggaggctga 60

ggcaggagaa ttgcttgaac tggggaggcgt gaagttgcag t

101

<210> 66

<211> 101

<212> DNA

<213> Homo Sapiens

<220>

<221> misc\_feature

<222> (51)..(51)

<223> n represents m repeats of a

<400> 66

caagatcgca gcattgcact ccagcctggg caacagaatg agattgtctc ngtgccacat 60

gccatgctat gtgcccaaag tttccttcac acaacacacgc c

101

<210> 67

<211> 101

<212> DNA

<213> Homo Sapiens

<400> 67

ttagagccag tcagaattca atctccaata tcctgactag cacaagaaat ycataggttg 60

attcttgttc tcctgcatct ctgcagggtgg caaacacctgat t

101

<210> 68

<211> 101

<212> DNA

<213> Homo Sapiens

<400> 68

tttgtgttt tcttaataaa ctttacccac ttataaaag aataaaatga rggtgagtt 60

aattctgact acgggattcc ttttcactt ttataatgaa c 101

<210> 69

<211> 101

<212> DNA

<213> Homo Sapiens

<400> 69

tccttctaac taaatcttat cataagcaaa tctatgcacc aaattattta rtacaattcc 60

taataacagc tgaaggacca tttatggaa gcaatgttca c 101

<210> 70

<211> 101

<212> DNA

<213> Homo Sapiens

<400> 70

ttagtacaat tcctaataac agctgaagga ccatttattt gaagcaatgt wcaccatagc 60

aaaattccag tgaagtctaa gaactggac agtccgttga g 101

<210> 71

<211> 101

<212> DNA

<213> Homo Sapiens

<400> 71

ttgccccatg aatgtgcaca tgcataattaa aatatggca cctcttttaa ktctttttt 60

tctcataata agtttcaaac tcacagtagg aaattgagag a

101

<210> 72

<211> 101

<212> DNA

<213> Homo Sapiens

<400> 72

tggttgttct cgaactagct ggttcccag agacagctgg agactgagca mataaagaca 60

tcattgagga aaaaggctac cttgtacotc atggagagct g

101

<210> 73

<211> 101

<212> DNA

<213> Homo Sapiens

<400> 73

catggagagc tgaaggctcg ataaatggga actgccaggt aatagctatg mtatttctga 60

cataaaattta aaaactagta ttgtttcttc tagctctgtt t

101

<210> 74

<211> 101

<212> DNA

<213> Homo Sapiens

<220>

<221> misc\_feature

<222> (51)..(51)

<223> n represents m repeats of a

<400> 74

taatgttaaa ttggatctat aaacataagt caattggct ctattatgtc ngagaatagg 60

agtttaact tatactgtg tttttaat attttgaagt a 101

<210> 75

<211> 101

<212> DNA

<213> Homo Sapiens

<400> 75

ataagtcaat ttggctctat tatgtcaaaa gagaatagga gttttaactt wtat ctgtgt 60

tttattaata ttttgaagta taggaacctc atggtagc a 101

<210> 76

<211> 101

<212> DNA

<213> Homo Sapiens

<400> 76

gtatgtgaca gggctgcat gcaccgggtgg tctgggagga acagaacagg rcaggagtt 60

cttctataca atagagaaca gaacaatgtt cttctataca a 101

<210> 77

<211> 101

<212> DNA

<213> Homo Sapiens

<400> 77

aggcgggccc aggctggtt tcgggcctgg cgctgagctg cctgtatgg rtttacttc 60

cttgggtttt ttactgaata taaaacaata taaaacaatg t 101

<210> 78

<211> 101

<212> DNA

<213> Homo Sapiens

<400> 78

tggttttact tccttgttgt ttttactgaa tatgaaacaa tataaaacaa kgtgagaggg 60

tctttctctc ctctcaatgt caacatcata tatgattgga g 101

<210> 79

<211> 101

<212> DNA

<213> Homo Sapiens

<400> 79

gctggtttgg ttgaagtttc tcttatcagt cagggacttt gcatttt~~a~~g ygtactttac 60

caccgacacc ctccccccccc agcacacaca cacacacaca c 101

<210> 80

<211> 101

<212> DNA

<213> Homo Sapiens

<400> 80

tcaggcactt tgcattttaa gcgtacttta ccaccgacac cctcccccc magcacacac 60

acacacacac acacacacac acacacaaca tagtgaatg g 101

<210> 81

<211> 101

<212> DNA

<213> Homo Sapiens

<220>

<221> misc\_feature

<222> (51)..(51)

<223> n represents m repeats of ca

<400> 81

ggcactttgc attttaagcg tactttacca ccgacaccct cccccccag naca~~t~~agtga 60

aatggacccg tgggaattat atgatagttg taatcaaaat a 101

<210> 82

<211> 101

<212> DNA

<213> Homo Sapiens

<400> 82

gcactttgca ttttaagcgt actttaccac cgacaccctc cccccccagc rcac~~a~~cacac 60

acacacacac acacacacac acaacatagt gaaatggacc c 101

<210> 83

<211> 101

<212> DNA

<213> Homo Sapiens

<220>

<221> misc\_feature

<222> (51)..(51)

<223> n represents tctc or deletion

<400> 83

tctggaagta aacttaaaat gaaaattaga atttgcttc aattatacta ntat~~c~~taaat 60

cttaatttga aatttaaattt attttgtctc tacccaaacc a 101

<210> 84  
<211> 101  
<212> DNA  
<213> Homo Sapiens

<400> 84  
tatactatct ctatctaaat cttaaatttga aatttaaattt attttgtctc yacccaaacc 60  
atcgatttca tggaaatgtt taaattttct ttttttttt t 101

<210> 85  
<211> 101  
<212> DNA  
<213> Homo Sapiens

<400> 85  
cttaatttga aatttaaattt attttgtctc tacccaaacc atcgatttca yggaaatgtt 60  
taaattttct tttttttttt ttttttgat ggagtctcac t 101

<210> 86  
<211> 101  
<212> DNA  
<213> Homo Sapiens

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (51)..(51)  
<223> n represents insertion of ttcc or none

<400> 86  
tattttgtct ctacccaaac catcgatttc atggaaatgt taaaattttc nttttttttt 60  
tttttttttg atggagtctc actctgtcgc ccaggctgga g 101

<210> 87

<211> 101

<212> DNA

<213> Homo Sapiens

<400> 87

aggctggagt gcagtggtc aatcttggct cactgcaacc tctgcctccc rggttcacac 60

catttcctcg cttagcctc ctgagtagct gggactacag g 101

<210> 88

<211> 101

<212> DNA

<213> Homo Sapiens

<400> 88

atttcctgc tttagcctcc tgtagtagctg ggactacagg tgccgcacac macacctggc 60

taattttttg tatttttagt agagatgggg tttcaccacg t 101

<210> 89

<211> 101

<212> DNA

<213> Homo Sapiens

<400> 89

acaacacactg gctaattttt tgtatttta gtagagatgg ggtttcacca ygttagccag 60

gatggtttcg atctcctgac ctcgtgatct gcctgcctcg g 101

<210> 90

<211> 101

<212> DNA

<213> Homo Sapiens

<400> 90

atccccatca atttaatagg aattaatgtt gaaatactag tatatatattt ycctttat 60

actaattgtt tatccatata aaaggcatttt taccattata t 101

<210> 91

<211> 101

<212> DNA

<213> Homo Sapiens

<400> 91

agtatatata ttccctttat atactaattt gatataccata taaaaggcattt mgtaaccattt 60

tatgaaagta tatatgccat tccataaaaa tataatctacc a 101

<210> 92

<211> 101

<212> DNA

<213> Homo Sapiens

<400> 92

ggaatttaaag aaaaaatgcc tttttcactt aagtcatcctt tcccctggca rtacatttcc 60

tgaactttta catacttaaa tagccagttt tgaaaatgtt a 101

<210> 93

<211> 101

<212> DNA

<213> Homo Sapiens

<400> 93

acattttaaa cagactcctt cccacaaactt attttcctt tccaggaata rgaatggcaa 60

ctgaattgtt ccttctttat tctatagctt taagtcaaac c 101

<210> 94

<211> 101

<212> DNA

<213> Homo Sapiens

<400> 94

gaatggcaac tgaattgttc cttctttatt ctatagctt aagtcaaacc yaacataagc 60

aatcaaccct tccaccatt gtcctcttc tagctgctta t 101

<210> 95

<211> 101

<212> DNA

<213> Homo Sapiens

<400> 95

ttgggggtga aataaaagat agaccctgc tgctctgcac gtagattcag yttgtatgcc 60

agggtgacat tttaatttac agtagtccag acacctaaac a 101

<210> 96

<211> 101

<212> DNA

<213> Homo Sapiens

<400> 96

gggtgaaat aaaagataga cccctgctgc tctgcacgta gattcagttt statgccagg 60

gtgacatttt aatttacagt agtccagaca cctaaacagg a 101

<210> 97

<211> 101

<212> DNA

<213> Homo Sapiens

<220>

<221> misc\_feature

<222> (51)..(51)

<223> n represents m repeats of t

<400> 97

caacattgtt ttcctttga tggctggga gttttcttat aagttttgg nctttcatt 60

agtgtgttag ttccatcatc atgtctgttt actattgaaa a 101

<210> 98

<211> 101

<212> DNA

<213> Homo Sapiens

<400> 98

ttgaaaatat aggcagctaa atccactgat agtctacttt ttttaaaaat ktgttcttga 60

tgttttgagc aggaaaatta tttgcaagaa acaaaagagtt t 101

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/006701

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/09, C12M1/00, C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/09, C12M1/00, C12Q1/68

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
MEDLINE (STN), BIOSIS/WPI (DIALOG), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq,  
JSTPlus (JOIS)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Shi, J. et al., Sequence variations in the mu-opioid receptor gene (OPRM1) associated with human addiction to heroin, Hum Mutat, 2002, Vol.19, No.4, pages 459 to 460	1-13
X	Szeto, C.Y. et al., Association between mu opioid receptor gene polymorphisms and Chinese heroin addicts, Neuroreport, 2001, Vol.12, No.6, pages 1103 to 1106	1-13
X	Gelernter, J. et al., Genetics of two mu opioid receptor gene (OPRM1) exon I polymorphisms: population studies, and allele frequencies in alcohol- and drug-dependent subjects, Mol.Psychiatry, 1999, Vol.4, No.5, pages 476 to 483	1-13



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search  
24 June, 2005 (24.06.05)Date of mailing of the international search report  
12 July, 2005 (12.07.05)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/006701

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	HIROTA, T. et al., Sequence variability and candidate gene analysis in two cancer patients with complex clinical outcomes during morphine therapy, <i>Drug Metab. Dispos.</i> , 2003, Vol.31, No.5, pages 677 to 680	1-13
X	Hoehe, M.R. et al., Sequence variability and candidate gene analysis in complex disease: association of mu opioid receptor gene variation with substance dependence, <i>Hum.Mol.Genet.</i> , 2000, Vol.9, No.19, pages 2895 to 2908	1-13
X	Uhl, G.R. et al., The mu opiate receptor as a candidate gene for pain: polymorphisms, variations in expression, nociception, and opiate responses, <i>Proc.Natl.Acad.Sci.USA</i> , 1999, Vol.96, No.14, pages 7752 to 7755	1-13
X	Mayer, P. et al., Allelic and somatic variations in the endogenous opioid system of humans, <i>Pharmacol.Ther.</i> , 2001, Vol.91, No.3, pages 167 to 177	1-13

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/006701

## Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
  
  
  
  
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
  
  
  
  
  
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

The technical feature common to the inventions as set forth in claims 1 to 13 resides in an oligonucleotide enabling the detection of a gene polymorphism in a mu-opioid receptor gene and a method using this oligonucleotide. However, a polymorphism site in a mu-opioid receptor gene has been already known in public (see, 'Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1999, Vol.96, pages 7752 to 7755', 'Human Molecular Genetics, 2000, Vol.9, No.19, pages 2895 to 2908', 'Pharmacology & Therapeutics, 2001, Vol.91, pages 167 to 177', etc.) and thus the above common technical feature cannot be considered as a special technical feature. Such being the case, there is no technical relevancy involving a special technical feature among claims 1 to 12 (continued to extra sheet)

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
  
  
  
  
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:  
The parts relating to SEQ ID NO:1 in claims 1 to 13.

## Remark on Protest

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/006701

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet(2)

and these inventions are not considered as being so linked as to form a single general inventive concept.

Therefore, the inventions as set forth in claims of the present case involve 98 inventions relating respectively to the oligonucleotides represented by SEQ ID NOS:1 to 98 in claims 1 to 13.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl.<sup>7</sup> C12N15/09, C12M1/00, C12Q1/68

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl.<sup>7</sup> C12N15/09, C12M1/00, C12Q1/68

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

## 国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

MEDLINE(STN), BIOSIS/WPI(DIALOG), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, JSTPlus(JOIS)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	Shi, J. et al., Sequence variations in the mu-opioid receptor gene (OPRM1) associated with human addiction to heroin, <i>Hum Mutat</i> , 2002, Vol. 19, No. 4, pp. 459-460	1-13
X	Szeto, C. Y. et al., Association between mu opioid receptor gene polymorphisms and Chinese heroin addicts, <i>Neuroreport</i> , 2001, Vol. 12, No. 6, pp. 1103-1106	1-13

C 欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

## の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
 「&」同一パテントファミリー文献

## 国際調査を完了した日

24.06.2005

## 国際調査報告の発送日

12.7.2005

## 国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

飯室 里美

4B 2936

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) 関連すると認められる文献		関連する請求の範囲の番号
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	
X	Gelernter, J. et al., Genetics of two mu opioid receptor gene (OPRM1) exon 1 polymorphisms: population studies, and allele frequencies in alcohol- and drug-dependent subjects, Mol Psychiatry, 1999, Vol. 4, No. 5, pp. 476-483	1-13
X	Hirota, T. et al., Sequence variability and candidate gene analysis in two cancer patients with complex clinical outcomes during morphine therapy, Drug Metab Dispos, 2003, Vol. 31, No. 5, pp. 677-680	1-13
X	Hoehe, M.R. et al., Sequence variability and candidate gene analysis in complex disease: association of mu opioid receptor gene variation with substance dependence, Hum Mol Genet, 2000, Vol. 9, No. 19, pp. 2895-2908	1-13
X	Uhl, G.R. et al., The mu opiate receptor as a candidate gene for pain: polymorphisms, variations in expression, nociception, and opiate responses, Proc Natl Acad Sci U S A, 1999, Vol. 96, No. 14, pp. 7752-7755	1-13
X	Mayer, P. et al., Allelic and somatic variations in the endogenous opioid system of humans, Pharmacol Ther, 2001, Vol. 91, No. 3, pp. 167-177	1-13

## 第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1.  請求の範囲\_\_\_\_\_は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2.  請求の範囲\_\_\_\_\_は、有意義な国際調査をできる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3.  請求の範囲\_\_\_\_\_は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

請求の範囲1-13に記載される発明の共通する技術的特徴は、ミューオピオイド受容体遺伝子の多型を検出するオリゴヌクレオチド及び該オリゴヌクレオチドを用いた方法である。しかし、ミューオピオイド受容体遺伝子の多型部位については、既に公知であるから（「Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1999, Vol. 96, pp. 7752-7755」、「Human Molecular Genetics, 2000, Vol. 9, No. 19, pp. 2895-2908」、「Pharmacology & Therapeutics, 2001, Vol. 91, pp. 167-177」等参照）、上記共通する技術的特徴は、特別な技術的特徴であるとは言えない。してみると、請求の範囲1-12は、特別な技術的特徴を含む技術的な関係にあるものとはいせず、単一の一般的発明概念を形成するように連関しているものとは認められない。

したがって、本出願の請求の範囲に記載された発明には、請求の範囲1-13のうち配列番号1～98で示されるオリゴヌクレオチドに係る98発明が包含されている。

1.  出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2.  追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3.  出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4.  出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

請求の範囲1-13のうち配列番号1に関する部分

## 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。